

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

“Estudo sobre interações entre
leveduras *Saccharomyces cerevisiae*
nas fermentações em batelada
alimentada em altas temperaturas.”

MELINE REZENDE MORAIS

Tese de Doutorado
2013



Instituto de Química

MELINE REZENDE MORAIS

“Estudo sobre interações entre leveduras *Saccharomyces cerevisiae* nas fermentações em batelada alimentada em altas temperaturas.”

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: **Prof^a. Dra. Cecília Laluce**

ARARAQUARA

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

M827e Morais, Meline Rezende
 Estudo sobre interações entre leveduras *Saccharomyces cerevisiae* nas fermentações em batelada alimentada em altas temperaturas / Meline Rezende Morais. –
Araraquara : [s.n], 2013
 132 f. : il.

 Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Química
 Orientador: Cecilia Lalue

 1. Biotecnologia. 2. Produção de etanol.
 3. Biomassa. 4. Fermentações mistas. 5. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Título.

Dados curriculares

Dados pessoais

Nome: Meline Rezende Moraes

Nome em citações bibliográficas: MORAIS, M. R.

Sexo: Feminino

Endereço Profissional:

Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP)

Instituto de Química de Araraquara (IQ) - Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química

Rua Prof. Francisco Degni, nº 55

Quitandinha – 14800-900

Araraquara-SP

Formação acadêmica/titulação

2007 – 2009: Mestrado em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Título: Parâmetros de fermentação e estabilidade genética de leveduras em ciclos sucessivos de fermentação. Orientadora: Cecília Lalue, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2002 – 2005: Graduação em Ciências Biológicas Modalidade Médica (Biomedicina), Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, São Paulo, Brasil.

Atuação profissional

2006 - 2007: Hospital Monsenhor Genésio, HMG, Juruiaia/MG, Brasil como responsável técnica pelo laboratório de análises clínica, no período de janeiro de 2006 a fevereiro de 2007.

Formação complementar

2006 – 2006 - Aperfeiçoamento Prevenção e Controle de Infecção H. (Carga horária: 180h). Universidade Federal de Alfenas.

2004 – Câncer e Marcadores Tumorais. (Carga horária: 8h). Health Consultoria e Treinamento.

2004 – Controle de Infecção Hospitalar. (Carga horária: 8h). Health Consultoria e Treinamento.

2003 – Suporte Básico de vida no Laboratório Clínico. (Carga horária: 3h). Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Brasil.

2003 – Como Vender Mais e Melhor. (Carga horária: 20h). Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas de Belo Horizonte.

Atuação Profissional

2006 – 2007 - Responsável Técnica pelo Laboratório de Análises Clínicas do HOSPITAL MONSENHOR GENÉSIO (HMG) Juruaia-MG, Brasil, em dedicação exclusiva.

12/2004 - 11/2005 - Estágio Voluntário no Laboratório de Análises Clínicas Santa Casa - UNIARA, no setor de Microbiologia Clínica, perfazendo um total de 44 horas.

12/2004 - 11/2005 - Estágio Voluntário no Laboratório de Análises Clínicas Santa Casa - UNIARA, na área de Coleta de Material Biológico, perfazendo um total de 50 horas.

12/2004 - 11/2005 - Estágio Voluntário no Laboratório de Análises Clínicas Santa Casa - UNIARA, perfazendo um total de 209 horas.

12/2003 - 11/2004 - Estágio Voluntário no Laboratório de Análises Clínicas Santa Casa - UNIARA, perfazendo um total de 264 horas.

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Gallardo, J. C. M.; Souza, C. S.; Cicarelli, R. M. B.; Oliveira, K. F.; MORAIS, M. R.; Laluze, C. Enrichment of a continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae* with the yeast *Issatchenkia orientalis* in the production of ethanol at increasing temperatures. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 38, p. 405-414, 2011.

Laluze, Cecilia ; Tognolli, João Olimpio; Oliveira, Karen Fernanda; Souza, Crisla Serra; Moraes, Meline Rezende. Optimization of temperature, sugar concentration and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 83, p. 627-637, 2009.

Resumos publicados em anais de congressos

MORAIS, M. R.; MASIERO, M. O. C. LALUCE, C. Competiton between yeast strains during fermentation above the optimal growth temperatures. In: IX Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages. Araraquara, SP. 2012, p. 96.

MORAIS, M. R.; Junior, M. M. MIRANDA M. Jr.; MORAIS M. R. Infecção Hospitalar Relacionada ao uso de Cateter. In: IV Congresso Londrinense de Biologia Aplicada a Saúde e I Simpósio Paranaense de Patologia Experimental. Londrina - PR. Revista Biosáude. Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina. Londrina.: Revista Biosáude., 2004. v. 6. p. 101-101.

Apresentações de Trabalho

Morais, M. R.; Masiero, M. O. C.; Laluce, C. Competition between strains of *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of sugarcane molasses. In: 13th International Congress on Yeasts, Madison, Wisconsin, USA. 2012

MORAIS, M. R.; Masiero, M. O. C.; Coradello, L. F. C.; Longo, E.; Laluce, C. . Revitalization of the yeast cream to improve the ethanol production in a cell-recycling fermentation process. In: 1st Brazilian BioEnergy Science and Technology Conference promovido pela Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (Sbbq) no Convenções de Campos de Jordão, Campos do Jordão, SP. 2011.

MORAIS, M. R.; Laluce, C. Differential media for detection of colony heterogeneity in yeast populations producing bioethanol in industrial processes. In: XXXIX Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (Sbbq), no Centro de Convenções Rafain Palace Hotel, Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. 2010.

MORAIS, M. R.; Oliveira, K. F.; Souza, C. S.; SILVA, L. A. F; Marchetto, R.; Laluce, C. Fed-batch fermentations using a pulse-feeding strategy and revitalized cells of *s. cerevisiae* as inoculum between fermentation cycles. In: XXXVIII Annual Meeting of The Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) no Centro de Convenções Hotel Monte Real, Águas de Lindóia, SP, Brazil. 2009.

MORAIS, M. R.; Oliveira, K. F.; Marchetto, R.; Laluce, C. Procedure proposed for ethanol production in a synthetic medium in a sucession of fermentation cycles with cell reuse. In: 25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, no Enotel: Porto de Galinhas, PE. Brazil. 2009.

MORAIS, M. R.; Junior, M. M. Infecção Hospitalar Relacionada ao uso de Cateter. In: IV Congresso Londrinense de Biologia Aplicada a Saúde e I Simpósio Paranaense de Patologia Experimental, 2004, Londrina. Revista Biosáude. Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina, 2004. v. 6. p. 101-101.. 2004

Participação em eventos científicos:

13th International Congress on Yeasts. Madison, Wisconsin, E.U.A. 2012.

XLI Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society. Foz do Iguaçu, PR. 2012.

1st Brazilian BioEnergy Science and Technology Conference. Campos do Jordão, SP. 2011.

XL Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society. Foz do Iguaçu, PR. 2011.

XXXIX Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society. Foz do Iguaçu, PR. 2010.

XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia, SP, 2009.

1ª reunião da “*International Academy of sensory Analysis*”, no Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP), São Paulo-SP.

Aperfeiçoamento de Nível Superior em “Prevenção e Controle de Infecção Hospitalar” pela Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL, Alfenas-MG, 2006.

Mini-curso: “Teste de Ames-monitoramento do risco de mutagênese ocupacional e ambiental”, realizado no Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, durante a VI Semana Biomédica de Araraquara, Araraquara-SP, 2005.

V Jornada Biomédica, e VI Semana Biomédica de Araraquara, realizado no Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, Araraquara-SP, 2005.

Mini-curso: “Automação em Hematologia”, realizado no Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, durante a VI Semana Biomédica de Araraquara, Araraquara-SP, 2005.

Palestra “Hemocultura”, realizado no Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, durante a VI Semana Biomédica de Araraquara, Araraquara-SP, 2005.

Curso: “Análise Laboratorial Microbiológica”, realizado Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, durante a 3º JoFarma – Jornada Farmacêutica da Uniara, Araraquara-SP, 2005.

Curso: “Diagnóstico Laboratorial de Infecções Virais”, realizado Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, durante a 3º JoFarma – Jornada Farmacêutica da Uniara, Araraquara-SP, 2005.

Curso: “Interferência de Medicamentos no Diagnóstico Clínico”, realizado Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, durante a 3º JoFarma – Jornada Farmacêutica da Uniara, Araraquara-SP, 2005.

Curso: “Hiperlipemias Importância do Diagnóstico Laboratorial”, realizado Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, durante a 3º JoFarma – Jornada Farmacêutica da Uniara, Araraquara-SP, 2005.

Projeto SEST SENAT, realizando atividades de orientação para a prevenção das parasitoses, Araraquara-SP, 2005.

Palestra: “Efeitos do Iogurte de Soja de Araraquara sobre Modelos Tumoriais em Buenos Aires”, realizada no Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, Araraquara-SP, 2005.

I Jornada Multidisciplinar- Tema Diabetes, promovida pela UNIARA – UNIVIDA, Araraquara-SP, 2005.

VI Congresso Londrinense de Biologia aplicada à Saúde, I Simpósio Paranaense de Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina e Instituto de Tecnologia e Desenvolvimento Econômico e Social, Londrina, 2004.

Mini-curso: “Células Tronco: Aspectos Básicos e Métodos de Obtenção”, durante o VI Congresso Londrinense de Biologia aplicada à Saúde e I Simpósio Paranaense de Patologia Experimental, Londrina-PR, 2004.

IV Jornada de Biomedicina, realizado no Centro Universitário de Araraquara-UNIARA, Araraquara-SP, 2004.

Mini-Curso: “Câncer e Marcadores Tumorais”, Araraquara-SP, 2004.

Mini-Curso: “Eletrocardiograma”, Araraquara-SP, 2004.

Mini-Curso: “Controle de Infecção Hospitalar”, Araraquara-SP, 2004.

IV Semana da Biomedicina e III Jornada de Biomedicina, realizada no Centro Universitário de Araraquara- UNIARA, Araraquara-SP, 2003.

Mini-curso: “Suporte Básico de Vida no Laboratório Clínico-1º Socorros”, realizada no Centro Universitário de Araraquara- UNIARA, durante a IV Semana da Biomedicina, Araraquara -SP, 2003.

Projeto “Olho Diabético”, realizado pela Secretaria Municipal de Saúde de Araraquara em parceria com o Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, Araraquara -SP, 2003.

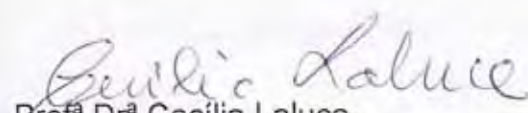
Curso de “Como Vender Mais e Melhor”, ministrado pelo SEBRAE (MG), Juruiaia-MG, 2003.

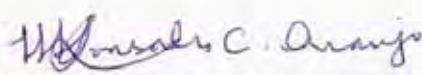
MELINE REZENDE MORAIS

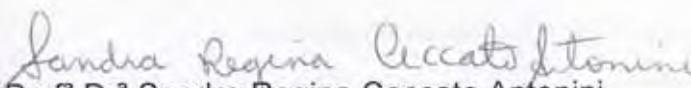
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

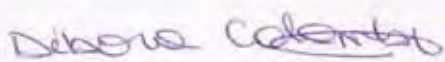
Araraquara, 25 de janeiro de 2013

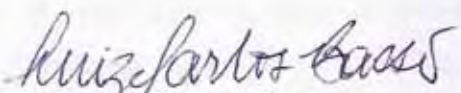
BANCA EXAMINADORA


Profª Drª Cecília Laluece
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Profª Drª Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Profª Drª Sandra Regina Ceccato Antonini
Centro de Ciências Agrárias – UFSCar, Araras


Drª Debora Colombi
Laboratório de Biotecnologia Genotyping – Botucatu


Prof. Dr. Luiz Carlos Basso
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP, Piracicaba

Dedicatória aos Amigos

*Um dia a maioria de nós irá separar-se.
Sentiremos saudades de todas as conversas jogadas fora, das descobertas que fizemos, dos
sonhos que tivemos, dos tantos risos e momentos que partilhamos.
Saudades até dos momentos de lágrimas, da angústia, das vésperas dos finais de semana, dos
finais de ano, enfim... do companheirismo vivido.
Sempre pensei que as amizades continuassem para sempre.
Hoje não tenho mais tanta certeza disso.
Em breve cada um vai para seu lado, seja pelo destino ou por algum desentendimento, segue a
sua vida.
Talvez continuemos a nos encontrar, quem sabe... nas cartas que trocaremos.
Podemos falar ao telefone e dizer algumas tolices... Até que os dias vão passar, meses...anos...
até este contato se tornar cada vez mais raro.
Vamo-nos perder no tempo.... Um dia os nossos filhos vão ver as nossas fotografias e
perguntarão: "Quem são aquelas pessoas?"
Diremos... que eram nossos amigos e..... isso vai doer tanto! "
Foram meus amigos, foi com eles que vivi tantos bons anos da minha vida!"
A saudade vai apertar bem dentro do peito.
Vai dar vontade de ligar, ouvir aquelas vozes novamente.....
Quando o nosso grupo estiver incompleto... reunir-nos-emos para um último adeus de um
amigo.
E, entre lágrimas abraçar-nos-emos. Então faremos promessas de nos encontrar mais vezes
desde aquele dia em diante.
Por fim, cada um vai para o seu lado para continuar a viver a sua vida, isolada do passado.
E perder-nos-emos no tempo..... Por isso, fica aqui um pedido deste humilde amigo: não deixes
que a vida te passe em branco, e que pequenas adversidades sejam a causa de grandes
tempestades....
Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores,
mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!"*

(Fernando Pessoa)

A Deus

Agradeço pela vida que me destes, pelas dádivas de cada dia. Devemos nos manter em constante estado de gratidão, pois, se refletirmos bem, teremos a certeza, que só de estarmos vivos, com saúde, participando desta maravilhosa proeza que é viver e de concretizar mais uma etapa, já é grande motivo, para sempre estarmos gratos ao Senhor.

Aos meus pais, Mauro e Maria das Graças

A vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade. A vocês, que iluminaram meus caminhos obscuros com afeto e dedicação para que os trilhasse sem medo e cheia de esperanças. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. Pela longa espera e compreensão durante minhas viagens. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que me acontece agora, quando procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras.

Amo vocês!

Aos meus irmãos Marcel e Mauro, pela amizade, generosidade e companheirismo em todas as situações.

AGRADECIMENTOS

Há muitas pessoas a quem deveria expressar os meus agradecimentos, mas com poucas palavras vou tentar falar de todos que mais contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Cecília Lalue, pela sua orientação, confiança, pela oportunidade de realizar este trabalho; e principalmente pelos conhecimentos científicos transmitidos.

A minha família que me apoiou incondicionalmente em todos os momentos. Obrigado por existirem e fazer parte de minha vida.

Aos membros da Banca examinadora, pela atenção, correção e contribuição na realização deste trabalho.

Ao eclético grupo de trabalho em que me orgulho de ter integrado, pelo ânimo, pela transfusão de conhecimentos, principalmente por se demonstrarem ao longo destes anos excelentes amigos e companheiros, sempre prontos a ajudar proporcionando-me momentos inesquecíveis, sendo eles: Maria Olivia, Jéssica, Luis Fernando (por toda a força e apoio nos momentos mais difíceis, sempre com uma palavra amiga...), Ismael, Ricardo.

Ao técnico do laboratório Fernando Delfino, pela amizade, paciência, confiança e auxílio durante o desenvolvimento do projeto.

Em especial a Waleska que além de amiga é irmã, confidente, companheira, pois sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, obrigado pela amizade e cumplicidade. Que Deus lhe guie sempre, dando-lhe coragem e mostrando a Sua vontade.

As pessoas que participaram desta trajetória, meus amigos e familiares, sejam de Araraquara ou Juruaia, ensinando-me muito sobre a vida e a convivência ao longo de todo o caminho! Os nomes de cada um de vocês nunca saem da minha mente, e acredito que não são protocolos para listar aqui em ordem alfabética. Mas gostaria de registrar os meus sinceros agradecimentos a cada um de vocês, e dizer muito obrigado por estarem sempre ao meu lado nos momentos em que mais precisei, pois graças a vocês que não me deixavam desistir desta caminhada, estou concluindo mais esta etapa de aprendizado.

A CAPES e CNPq pela bolsa concedida a mim e pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

As Usinas Zilor e São Martino pela disponibilidade em doar a matéria-prima (melaço) utilizada nesta pesquisa.

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade de cursar o doutorado.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica e Tecnológica Química, e principalmente as funcionárias da Seção de Pós-Graduação, pela atenção e paciência.

Muito Obrigada

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

(Madre Teresa de Calcuta)

Resumo

RESUMO

Fermentações sucessivas com alta densidade celular são realizadas em Usinas de produção de etanol no Brasil e devido às dificuldades de esterilização, bactérias e leveduras selvagens competem entre si por nutrientes e pela dominância no processo. O objetivo do presente estudo consistiu em melhorar as condições de clarificação do melaço, propagação e fermentação da linhagem de levedura *Saccharomyces cerevisiae* do laboratório IQAr/45-2, visando a maior produção de etanol sem perda de viabilidade nos processos com e sem reutilização celular. Estudou-se também as associações entre a levedura IQAr/45-2 e as leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1). Para a clarificação do melaço variou-se o acidulante (fosfato e ácido sulfúrico), pH inicial do melaço, temperatura e tempo de decantação, com intuito de levar a uma maior remoção de impurezas presente nesta matéria-prima. A melhor condição de propagação para levedura IQAr/45-2 consistiu em três etapas de concentrações crescentes de açúcar no melaço (4%, 8% e 12%) à 30°C com agitação (100 rpm). Esta condição de propagação levou a um rendimento de biomassa de 6,1g.L⁻¹. Elevando-se a temperatura para 37°C, o tempo de propagação de cada etapa pode ser reduzido para 12h (cada) à custa de um aumento em uma etapa (melaço 3%, 5%, 8% e 12%), com biomassa variando de acordo com a levedura: 7,6g.L⁻¹ para PE-2, 6,7g.L⁻¹ para SA-1, 6,4g.L⁻¹ para CAT-1 e 2,5g.L⁻¹ para IQAr/45-2. Apesar de apresentar um menor crescimento a 37°C, a levedura IQAr/45-2 não mostrou instabilidade genética em meios cromogênicos diferenciais. Para otimizar as condições de fermentação da levedura IQAr/45-2 em mini-reatores variou-se o tempo e fluxo de alimentação, temperatura e concentração de açúcar no mosto de alimentação visando um maior rendimento de etanol em batelada alimentada. A condição de escolha para conduzir a fermentação foi utilização de um fluxo de alimentação 0,39 mL/min. por 3 horas com melaço 20% (ART) suplementado (DAP, sulfato de zinco e magnésio) em um tempo de fermentação de 7 horas à 37°C para um volume final de trabalho de 100mL e uma concentração de células de aproximadamente 24g.L⁻¹. Os efeitos das combinações entre as leveduras IQAr/45-2 com as leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) sobre os rendimentos em etanol e biomassa foram obtidos a 40°C. Em culturas únicas da levedura IQAr/45-2, o rendimento do etanol foi maior que os obtidos nas fermentações utilizando culturas mistas. Em fermentações mistas entre duas leveduras, a melhor combinação quanto à produção de etanol foi entre a levedura IQAr/45-2 e PE-2 enquanto que a associação de PE-2 e CA-1 favoreceu o acúmulo de biomassa. A combinação da levedura IQAr/45-2 com duas leveduras industriais mostrou efeito negativo, o qual foi revertido quando a levedura IQAr/45-2 foi adicionada no inoculo mistos constituído por 3 leveduras industriais (proporção 1:1:1:1). Assim, a levedura IQAr/45-2 parece ser capaz de recuperar os processos de fermentação mista.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. Produção de etanol. Biomassa. Fermentações mistas.

Abstract

ABSTRACT

Successive fermentations at high cell densities and cell reuse currently take part of the routine of Brazil distilleries for fuel ethanol production. Due to difficulties related to sterilization, bacteria and *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts compete with each other for nutrients and dominance of the process. The aim of the present work is to optimize and improve processes for molasses clarification, inoculum propagation, fermentation conditions and storage of *Saccharomyces cerevisiae* IQAr/45-2 between fermentation cycles with and without revitalization in order to minimize losses in ethanol production and viability during repetitive fermentations. It was also studied associations between the strain IQAr/45-2 and industrial yeasts (PE-2, CAT-1 and SA-1). In order to improve conditions for molasses clarification, acidification agents (phosphate and sulfuric acid), initial pH, temperature and decantation time were varied during the experiments. The best propagation condition for the strain IQAr/45-2 consisted on three consecutive steps of growth in increasing sugar concentrations (4%, 8% and 12%) at 30°C with agitation (100 rpm). Under these conditions, the biomass accumulated at the end of the propagation was 6.1 g.L⁻¹. On the other hand, raising the propagation temperature from 30°C to 37°C, the time of each step decreased from 24h to 12h, while the biomass formed at the end of the entire propagation varied with the strain as follows: 7,6 g.L⁻¹ for PE-2, 6,7g.L⁻¹ for SA-1, 6,4g.L⁻¹ for strain CAT-1 e 2,5g.L⁻¹ for strain IQAr/45-2. Any genetic instability occurred, as shown by the colonies formed on the differential chromogenic medium, when samples from the final culture propagated at 37°C were plated. Optimization of the fermentation conditions for the strain IQAr/45-2 was established in mini-reactors in order to obtain maximal amount of ethanol with the least drop in viability and this resulted from adjustments of the feeding time and the flux rate. The best condition for fermentation consisted of utilizing a fed time of 3h (0.39 ml/min), a cell concentration of approximately 24g.L⁻¹, feed the reactors with 20% molasses (TRS) enriched with the addition of minerals (DAP, zinc and magnesium sulphate) and adjusted the final working volume to 100 mL at 37°C. Interactions between IQAr/45-2 and the three industrial strains (PE-2, SA-1, CAT-1) were determined in relation to ethanol production and biomass formation during fermentation at 40°C. In fermentations using the single culture of IQAr/45-2, the ethanol yield was higher than those obtained in fermentations using the mixed cultures. The best combination of two strains for ethanol production was IQAr/45-2 plus PE-2, while the association between PE-2 and CAT-1 led to the higher biomass. The association between IQAr/45-2 and two other industrial strains showed a negative effect in relation to all dependent variables. However, this negative effect was reverted when the strain IQAr/45-2 was included in the mixed inoculum containing the three industrial strains (proportion 1:1:1:1). Although, the complexity is much greater in industrial fermentations strains, IQAr/45-2 is a good candidate to revert sluggish or stuck fermentation.

Keyword: *Saccharomyces cerevisiae*. Ethanol production. Biomass. Co-fermentations.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ART - açúcar redutores totais (g.L^{-1})

ATP - adenosina trifosfato

BOD - câmara incubadora

CLB - colônia lisa de bactéria

CLL - colônia lisa de leveduras

CR - colônias rugosas de levedura

$^{\circ}\text{C}$ – graus centígrados

DAP - di-amônio fosfato

DO - densidade óptica

DP – desvio padrão

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

NAD⁺ - nicotinamida adenosina dinucleotideo

nm - nanômetro

P - produto (etanol)

μ_{Pmax} - taxa específica máxima formação de produto

μ_{p} - formação de produto

μ_{x} - velocidades específicas de crescimento celular

μ_{xmax} - taxa específica máxima de crescimento celular

P₀ - concentração inicial de etanol (g.L^{-1});

P_f - concentração final de etanol (g.L^{-1});

pH – potencial hidrogeniônico

Pro - produtividade.

ProÁlcool – Programa Nacional do Álcool

q.s.p - quantidade suficiente para

rpm - rotações por minuto

S - concentração de substrato (açúcar)

S₀ - concentração inicial de substrato (açúcar, g.L^{-1});

S_f - concentração de açúcar final (g.L^{-1});

T - tempo de fermentação (h)

T_F - Tempo final de fermentação;

v/v – volume/volume

WLN - Wallerstein Laboratory nutrient medium

X - concentração celular no instante t

X₀ - concentração celular inicial

X_F – concentração celular final;

YPD - extrato de levedura, peptona e glicose

Y_{P/S} – fator de conversão do substrato em produto

Y_{x/S} – fator de conversão das células com relação ao substrato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da estrutura interna da célula de levedura gerando um broto.	37
Figura 2 - Representação da reprodução assexuada (brotamento) da levedura <i>S. cerevisiae</i> .	39
Figura 3 - Representação esquemática do ciclo celular da levedura <i>S. cerevisiae</i> .	40
Figura 4 - Diversidade de áreas que envolvem as leveduras na aplicação industrial e biotecnológica.	41
Figura 5 - Fluxograma da propagação do inóculo em três etapas crescentes de açúcar à 30°C em repouso (BOD).	50
Figura 6 – Fluxograma de propagação do inóculo em três etapas crescentes de açúcar à 30°C sob agitação (100 rpm).	50
Figura 7 - Fluxograma de propagação do inóculo em quatro etapas crescentes de açúcar no melaço à 37°C.	51
Figura 8 - Mini-reator utilizado nas fermentações em batelada alimentada, com capacidade para 200 mL construído pela Marconi S.A. de Piracicaba (mod. MA502/4).	53
Figura 9 - Bomba peristáltica MasterFlex®, modelo 7518-00 utilizada para alimentação dos fermentadores.	53
Figura 10 - Curva-padrão para a relação de biomassa seca da levedura IQAr/45-2 com valores de absorbância. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $a=1,8947$, coeficiente linear $b=0,0078$, fator de correlação ($R^2 = 0,9987$), assim obtendo o fator de correlação absorbância em biomassa seca (F) foi de 0,528 (1/b) para o espectrofotômetro BIOESPECTRO modelo SP-22.	124
Figura 11 - Curva-padrão para a relação de biomassa seca da levedura PE-2 com valores de absorbância. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $a=1,531$, coeficiente linear $b=0,0073$, fator de correlação ($R^2 = 0,9931$), assim obtendo o fator de correlação absorbância em biomassa seca (F) foi de 0,653 (1/b) para o espectrofotômetro BIOESPECTRO modelo SP-22.	125
Figura 12 - Curva-padrão para a relação de biomassa seca da levedura CAT-1 com valores de absorbância. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $a=1,742$, coeficiente linear $b=0,0809$, fator de correlação ($R^2 = 0,99978$), assim obtendo o fator de correlação absorbância em biomassa seca (F) foi de 0,574 (1/b) para o espectrofotômetro BIOESPECTRO modelo SP-22.	126

- Figura 13** - Curva-padrão para a relação de biomassa seca da levedura SA-1 com valores de absorbância. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $a=1,535$, coeficiente linear $b=0,0595$, fator de correlação ($R^2 = 0,9936$), assim obtendo o fator de correlação absorbância em biomassa seca (F) foi de $0,651 (1/b)$ para o espectrofotômetro BIOESPECTRO modelo SP-22. 127
- Figura 14** - Determinação da viabilidade celular de leveduras com azul de metileno. As células coradas de azul são células mortas enquanto as incolores são células viáveis. 56
- Figura 15** - Curva de solução de glicose 0,2% (% m/v) para a dosagem do açúcar residual total pelo método de 3,5 DNS (MILLER, 1959). A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=28,74$, intercepto da reta $a=-0,098$ e fator de correlação ($R^2 = 0,999$) para o espectrofotômetro BIOESPECTRO (SP-22). 128
- Figura 16** - Curva padrão de calibração de soroalbumina 1% (m/v) para a dosagem de proteína total pelo método do reagente de Biureto. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=0,751$, intercepto da reta $a=-0,045$ e fator de correlação ($R^2=0,999$) para o espectrofotômetro BIOESPECTRO (SP-22). 130
- Figura 17** - Curva padrão de calibração de glicose $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para dosagens de trealose pelo método da Antrona. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=0,030$, intercepto da reta $a=-0,009$ e fator de correlação ($R^2=0,994$) para o espectrofotômetro BIOESPECTRO (SP-22). 131
- Figura 18** - Curva padrão de calibração de glicerol $0,208 \text{ mg.mL}^{-1}$ para dosagens de glicerol através de kit enzimático. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=92,17$, intercepto da reta $a=-0,001$ e fator de correlação ($R^2=0,997$) para o espectrofotômetro BIOESPECTRO (SP-22). 132
- Figura 19** - Reproduzindo os dados da tabela 3 avaliamos o efeito do aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço (melaço 4% -■-, melaço 8% -●- e melaço 12% -▲-) em cada uma das três etapas de propagação da levedura IQAr/45-2 sobre as curvas de tempo de biomassa (A), etanol (B) e açúcares redutores totais – ART (C) em repouso (BOD) a 30°C. A viabilidade não variou, ficando em aproximadamente $99\% \pm 0,2$ durante o crescimento. 74
- Figura 20** - Reproduzindo os dados da tabela 4 avaliamos o efeito do aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço, da relação $\text{Vol}_{\text{frasco}}/\text{Vol}_{\text{meio}}$ (proporção 5:1 na parte “A” e “C”, proporção 5:2 na parte “B” e “D”) e da agitação (100 rpm em “shaker” ou sem agitação em BOD) sobre os valores iniciais (-■-) e finais (-□-) de biomassa durante as três etapas consecutivas de crescimento da levedura IQAr/45-2 à 30°C. A viabilidade não variou, ficando em 76

aproximadamente $98,6\% \pm 1,47$.

- Figura 21** - Reproduzindo os dados da tabela 5 avaliamos o efeito do aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço, (melaço 4% -■-, melaço 8% -●- e melaço 12% -▲-) sobre as medidas de biomassa (A), etanol (B) e açúcares redutores totais – ART (C) nas três etapas da propagação da levedura IQAr/45-2 incubadas a 30°C sob baixa agitação. A viabilidade não variou, ficando em aproximadamente $99\% \pm 1,5$ ao longo das três etapas de propagação. 78
- Figura 22** - Reproduzindo os dados da tabela 6 avaliamos o efeito do aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço (melaço 3%, 5%, 8% e 12%) sobre as medidas de biomassa (A), etanol (B) e açúcares redutores totais – ART (C) em cada uma das quatro etapas da propagação da levedura IQAr/45-2 e das leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) em baixa agitação a 37°C. 80
- Figura 23** – Plaqueamento da levedura IQAr/45-2 em meio Nagai (A) e meio WLN (B) após 5 dias de incubação à 30°C. 82
- Figura 24** – Plaqueamento da levedura PE-2 em meio Nagai (A) e meio WLN (B) após 5 dias de incubação à 30°C. 82
- Figura 25** – Plaqueamento da levedura CAT-1 em meio Nagai (A) e meio WLN (B) após 5 dias de incubação à 30°C. 83
- Figura 26** – Plaqueamento da levedura SA-1 em meio Nagai (A) e meio WLN (B) após 5 dias de incubação à 30°C. 83
- Fig. 27** – Reproduzindo os dados da tabela 9, avaliamos os resultados obtidos para medidas iniciais e finais de viabilidade (A), biomassa (B) durante a revitalização da levedura IQAr/45-2 à 37°C nos diferentes meios: (-■-) melaço 5% e pH 4,5; (-■-) melaço 5% e pH 6,0; (-■-) melaço 5% e pH 6,0 com adição de suplementos; (-■-) melaço 5% e pH 4,5; (-■-) melaço 5% e pH 6,0 e (-■-) melaço 5% e pH 6,0 com adição de suplementos. **Suplementos utilizados no meio de revitalização:** 0,1% de DAP, 0,01 % de sulfato de magnésio heptahidratado e 0,01 % de sulfato de zinco heptahidratado. 87
- Figura 28** – Reproduzindo os dados da tabela 10 avaliamos o efeito da variação no tempo de alimentação do melaço (3h e 5h) nas fermentações em bateladas alimentadas únicas com a levedura IQAr/45-2 sobre as medidas de biomassa (A), etanol (B) e consumo de açúcar redutor total – ART (C) em melaço 20% (ART): (■) = tempo de alimentação de 3h (0,39 mL/min); (●) = tempo de alimentação de 5h (0,23 mL/min). **Condições da fermentação:** inoculo de 24 g.L⁻¹ (9%, v/v) e temperatura 37°C. 88
- Fig. 29** – Reproduzindo os dados da tabela 11 avaliamos o efeito da variação da temperatura associada a variação da concentração do melaço sobre as 91

curvas de biomassa (A, B e C) e açúcar residual total- ART (D, E e F) em ciclos únicos de fermentação em bateladas alimentadas únicas da levedura IQAr/45-2 com 7 horas de duração, sendo: fermentações utilizando melão 18% ART a 34°C (-■-) e 37°C (-●-); fermentações utilizando melão 20% ART 34°C (-□-), 37°C (-○-) e 40°C (-△-) e fermentações a 40°C com melão 20% ART (-△-) e melão 22% (-▽-).

- Figura 30** – Reproduzindo os dados da tabela 12 avaliamos o efeito da variação de temperatura (30°C a 42°C) em fermentações em bateladas alimentadas únicas com a levedura IQAr/45-2 sobre as medidas de viabilidade (A), biomassa (B), durante 7 horas fermentação. **Condições da propagação:** propagação II (100 rpm, à 30°C). **Condições da fermentação:** melão 20% (ART) adicionada em 3 horas (0,39 mL/min.), inoculo de 24 g/L⁻¹ (9%, v/v) e pH 4,5. 94
- Figura 31** – Reproduzindo os dados da tabela 12 avaliamos o efeito da variação de temperatura (faixa de 30°C a 42°C) em fermentações em bateladas alimentadas únicas com a levedura IQAr/45-2 sobre as medidas de etanol (A), açúcar residual – ART (B), durante 7 horas fermentação. **Condições da propagação:** propagação II (100 rpm, à 30°C). **Condições da fermentação:** melão 20% (ART) adicionada em 3 horas (0,39 mL/min.), inoculo de 24 g/L⁻¹ (9%, v/v) e pH 4,5. 95
- Figura 32** – Reproduzindo os dados da tabela 13 avaliamos a variação nas medidas iniciais (-■-) e finais (-●-) para: viabilidade (parte “A”), biomassa (parte “B”), produção de etanol (parte “C”) e açúcar residual total - ART (parte “D”) durante oito ciclos sucessivos de fermentação à 37°C. **Condições da propagação:** propagação II (100 rpm, à 30°C). **Condições da fermentação:** melão 20% (ART) adicionada em 3 hora (0,39 mL/min.), inoculo de 24 g/L⁻¹ (9%, v/v) tempo de fermentação 6hs. **Condições da fermentação:** estocagem das células entre os ciclos de fermentação à 4°C. 97
- Figura 33** – Reproduzindo os dados da tabela 14 avaliamos as medidas dos parâmetros do processo: viabilidade (A), biomassa (B) etanol (C) e ART (D) durante a fermentação de 8 ciclos sucessivos à 37°C, utilizando ART de 20% no melão de alimentação (fluxo de 0,39mL/min. durante 3h), inoculo de 24g.L⁻¹ (9%, v/v) com tempo de fermentação 6 horas, sendo: (■)= valores do início da fermentação; (●)= valores do final da fermentação. **Condições da fermentação:** estocagem das células entre os ciclos de fermentação em melão 8% suplementado (1% de DAP, 0,1% ZnSO₄.7H₂O e 0,1% MgSO₄.7H₂O) incubado à 30°C e baixa agitação (100 rpm) por 16 horas. 101
- Figura 34** – Reproduzindo os dados da tabela 15 avaliamos os gráficos de fermentação para comparar a levedura IQAr/45-2 com as leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) quanto a variação em rendimento de biomassa (A) etanol (B) e açúcar residual- ART (C) durante uma 103

batelada única à 40°C, utilizando ART de 20% no melaço suplementado, inoculo de 24g.L⁻¹ (9%, v/v) com tempo de fermentação 7 horas.

- Figura 35** – Reproduzindo os dados da tabela 6 industrial, quanto a variação em biomassa **(A)** etanol **(B)** e ART **(C)** durante uma batelada única de fermentação à 40°C, utilizando ART de 20% no melaço suplementado de alimentação (fluxo de 0,39mL/min. durante 3h), inoculo de 24g.L⁻¹ (9%, v/v) com tempo de fermentação 7 horas. 106
- Figura 36** – Reproduzindo os dados da tabela 17 avaliamos as fermentações mistas utilizando a levedura IQAr/45-2 associada a duas leveduras industriais, quanto a variação em biomassa **(A)** etanol **(B)** e ART **(C)** durante uma batelada única de fermentação à 40°C, utilizando ART de 20% no melaço de alimentação (fluxo de 0,39mL/min. durante 3h), inoculo de 24g.L⁻¹ (9%, v/v) com tempo de fermentação 7 horas. 108
- Figura 37** – Reproduzindo os dados da tabela 18 avaliamos as curvas de fermentações mistas utilizando a levedura IQAr/45-2 associada a três leveduras industriais, quanto a variação em viabilidade **(A)**, biomassa **(B)** etanol **(C)** e ART **(D)** durante uma batelada única de fermentação à 40°C, utilizando ART de 20% no melaço suplementado de alimentação (fluxo de 0,39mL/min. durante 3h), inoculo de 24g.L⁻¹ (9%, v/v) com tempo de fermentação 7 horas, sendo valores referente a: levedura IQAr/45-2 (-■-) e fermentação mista entre as leveduras IQAr/45-2+PE-2+CAT-1+SA-1 (-●-). 111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito do pH inicial ajustado com ácido sulfúrico ou adição de fosfato antes do aquecimento (100°C por 30 min) em vapor de autoclave e tempo de decantação do melaço <u>em BOD a 30°C.</u>	70
Tabela 2 - Efeito do pH inicial ajustado com ácido sulfúrico ou adição de fosfato antes do aquecimento (100°C por 30 min) em vapor de autoclave e tempo de decantação do melaço <u>em câmara fria a 4°C.</u>	72
Tabela 3 - Efeito do aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço (4%, 8% e 12%) sobre os valores iniciais e finais das medidas descritas na Fig. 22, para viabilidade, biomassa, etanol, açúcares redutores totais (ART) nas três etapas da propagação da levedura IQAr/45-2 em cultivo estacionário (BOD) a 30°C.	75
Tabela 4 – Efeito do aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço, da relação $\text{Vol}_{\text{frasco}}/\text{Vol}_{\text{meio}}$ (proporção 5:1 na parte “A” e “B”, proporção 5:2 na parte “C” e “D”) e da agitação (“shaker” ou sem agitação) sobre os valores iniciais e finais de biomassa descritos na Fig. 20 durante as três etapas consecutivas de crescimento da levedura IQAr/45-2 à 30°C.	77
Tabela 5 – Efeito do aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço sobre as medidas finais de viabilidade, etanol, açúcares redutores totais (ART) descritas na Fig. 21 e biomassa (inicial e final), nas três etapas da propagação da levedura IQAr/45-2 com pouca aeração (agitação de 100 rpm) a 30°C.	79
Tabela 6 – Efeito do aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço sobre as medidas finais descritas na Fig. 22 para viabilidade, etanol, açúcares redutores totais (ART) e biomassa (inicial e final), nas quatro etapas da propagação da levedura IQAr/45-2 e das três leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) em baixa agitação a 37°C.	81
Tabela 7 – Comparação dos três tipos de propagação em concentrações crescentes de açúcar no melaço não suplementado pela levedura IQAr/45-2.	84
Tabela 8 – Comparação dos rendimentos de biomassa no final da propagação entre a levedura IQAr/45-2 e as três leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) em melaço não suplementado sob baixa agitação a 37°C.	85
Tabela 9 – Variações em viabilidade, biomassa e etanol das células do leite de levedura suspensas em melaço contendo 5% e 8% de açúcar na presença ou não de suplemento após 12 horas de incubação com agitação de 100 rpm a 37°C.	86
Tabela 10 – Efeito da variação no tempo de alimentação do melaço nas fermentações em bateladas alimentadas únicas sobre as médias de	89

viabilidade, etanol, açúcares redutores totais (ART) e biomassa (inicial e final), durante 7 horas fermentação em sistema alimentado com melaço suplementado 20% ART (dados obtidos na Fig. 28).

Tabela 11 – Efeito da variação de temperatura associada as variações em concentração de açúcar no melaço suplementado, em fermentações em bateladas alimentadas únicas da levedura IQAr/45-2 (dados fornecidos pela Fig. 29) sobre as medidas finais de viabilidade, biomassa, etanol e açúcares redutores totais (ART) durante 7 horas fermentação.	92
Tabela 12 – Efeito da variação de temperatura (30°C à 42°C) nas fermentações em bateladas alimentadas únicas sobre as medias (obtidas nas Figuras 30-31) de viabilidade, biomassa, etanol e açúcares redutores totais (ART) da levedura IQAr/45-2 durante 7 horas fermentação em sistema alimentado com melaço de 20% (ART).	96
Tabela 13 – Valores obtidos das médias iniciais e finais (descritos na Fig. 32) de viabilidade, biomassa, etanol e ART durante cada ciclo de fermentação à 37°C, utilizando melaço 20% de ART durante 6 horas de fermentação por 8 ciclos sucessivos.	98
Tabela 14 – Valores obtidos das médias iniciais e finais (descritos na Fig. 33) de viabilidade, biomassa, etanol e ART durante cada ciclo de fermentação à 37°C, utilizando melaço 20% de ART durante 6 horas de fermentação por 8 ciclos sucessivos.	100
Tabela 15 – Comparação da levedura IQAr/45-2 com as leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) quanto aos valores iniciais e finais de viabilidade, biomassa, etanol e açúcar residual em bateladas únicas de fermentação à 40°C (dados da Fig. 34).	104
Tabela 16 – Comparação da levedura IQAr/45-2 com as leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) em fermentações mistas (proporção 1:1) quanto aos valores iniciais e finais de viabilidade, biomassa, etanol e açúcar residual em bateladas únicas de fermentação a 40°C, utilizando ART de 20% no melaço (dados da Fig. 35).	107
Tabela 17 – Comparação da levedura IQAr/45-2 com as leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) em fermentações mistas (proporção 1:1:1) quanto aos valores iniciais e finais de viabilidade, biomassa, etanol e açúcar residual em bateladas únicas de fermentação a 40°C, utilizando ART de 20% no melaço.	110
Tabela 18 – Comparação da levedura IQAr/45-2 com a fermentação mista desta levedura associadas as três leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) quanto aos valores iniciais e finais de viabilidade, biomassa, etanol e açúcar residual em bateladas únicas de fermentação a 40°C, utilizando ART de 20% no melaço.	113

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
1.1 Etanol: Importância na economia brasileira	31
1.2 Fermentação	32
1.2.1 Tipos de Fermentação	32
1.2.2 Estresses Fermentativos	34
1.2.2.1 Estresse osmótico	35
1.2.2.2 Estresse térmico	36
1.2.2.3 Estresse etanólico	36
1.3 Leveduras	37
1.3.1 Fisiologia da fermentação	37
1.3.2 Metabolismo	38
1.3.3 Reprodução	38
1.3.4 Aplicações	40
1.3.5 Reutilização de células na fermentação etanólica	42
1.3.6 Interações entre leveduras em cultivos mistos	43
2 OBJETIVOS	45
3 MATERIAS E MÉTODOS	47
3.1 Leveduras	48
3.2 Técnicas de cultivo	48
3.2.1 Melaço	48
3.2.1.1 Suplementação do Melaço	48
3.2.1.2 Clarificação do melaço em escala de laboratório	48
3.2.2 Propagação do fermento em melaço em escala de laboratório	49
3.2.3 Preparo do leite de levedura	51

3.2.4 Ativação ou estocagem do leite de levedura entre ciclos de fermentação	52
3.2.5 Fermentações em batelada alimentada: únicas e sucessivas	52
3.3 Ensaaios analíticos	54
3.3.1 Medida de biomassa celular	54
3.3.2 Viabilidade celular	56
3.3.3 Dosagem de etanol	57
3.3.4 Açúcar residual total (ART)	57
3.3.5 Proteína Total	59
3.3.6 Trealose Intracelular	60
3.3.7 Medidas de glicerol interno	61
3.3.8 Medidas de pH	62
3.4 Meios de culturas diferenciais	62
3.4.1 Preparo dos meios	62
3.5 Tratamento Estatístico	64
3.6 Cálculos dos Parâmetros cinéticos da fermentação	65
3.6.1 Velocidades específicas de transformação	65
3.6.2 Fator de conversão de substrato a células	65
3.6.3 Fator de Conversão do Substrato em Produto ($Y_{P/S}$)	66
3.6.4 Produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	66
3.6.5 Rendimento etanólico	67
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1 Escolha do método para clarificação do melaço	69
4.2 Propagação em melaço não suplementado	73
4.2.1 Efeito da concentração do açúcar no melaço não suplementado sobre as três etapas de propagação da levedura IQAr/45-2 a 30°C sem agitação (propagação I).	73

4.2.2 Efeito do aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço não suplementado, relação $\text{Vol}_{\text{frasco}}/\text{Vol}_{\text{meio}}$ e da agitação sobre a propagação em três etapas da levedura IQAr/45-2 a 30°C.	75
4.2.3 – Efeito do aumento progressivo da concentração do açúcar no melaço não suplementado sobre as três etapas de propagação da levedura IQAr/45-2 em baixa agitação (80rpm) a 30°C (propagação II).	77
4.2.4 Efeito do aumento progressivo da concentração do melaço não suplementado durante as quatro etapas da propagação da levedura IQAr/45-2, comparando com as 3 leveduras comerciais (PE-2, CAT-1 e SA-1) a 37°C em baixa agitação (propagação III).	80
4.2.5 Comparação entre as três formas de propagação utilizada para as leveduras.	84
4.3 Efeito da concentração de açúcar no melaço de estocagem do leite de levedura usado entre ciclos sucessivos de fermentação.	85
4.4 Padronização de fermentações em bateladas únicas alimentadas da levedura IQAr/45-2 em melaço suplementado.	87
4.4.1 Efeito do fluxo e tempo de alimentação do melaço 20% (ART) sobre a fermentação da levedura IQAr/45-2 a 37°C.	87
4.4.2 Efeito da concentração do açúcar no melaço suplementado (18% a 22% ART) sobre a fermentação com a levedura IQAr/45-2 com temperaturas variando de 34°C a 40°C.	90
4.4.3 Efeito das variações crescentes de temperatura nas fermentações em bateladas alimentadas com melaço suplementado 20% (ART) para levedura IQAr/45-2.	93
4.4.4 Ciclos sucessivos de fermentação com a levedura IQAr/45-2 a 37°C utilizando melaço 20% de ART, intercalados por períodos de estocagem a 4°C entre um ciclo de fermentação e outro.	97
4.4.5 Ciclos sucessivos de fermentação com a levedura IQAr/45-2 a 37°C utilizando melaço 20% de ART, intercalados por estocagem das células em melaço 8% de ART (sem suplementação), pH 6,0 a 30°C entre um ciclo e outro.	99
4.5 Competição entre a levedura IQAr/45-2 e as leveduras industriais (PE-2, CAT-1 E SA-1) em fermentações individuais e mistas a 40°C em melaço suplementado com ART inicial de 20%.	102
4.5.1 Competição entre a levedura IQAr/45-2 e as leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) em fermentações individuais a 40°C usando-se melaço suplementado com ART inicial de 20%.	102

4.5.2 Competição entre a levedura IQAr/45-2 associação a uma levedura industrial (PE-2, CAT-1 E SA-1) em fermentações mistas a 40°C em melaço suplementado com ART inicial de 20%.	105
4.5.3 Competição entre a levedura IQAr/45-2 associada a duas leveduras industriais (PE-2, CAT-1 E SA-1) em fermentações mistas a 40°C em melaço suplementado com ART inicial de 20%.	108
4.5.4 Competição entre a levedura IQAr/45-2 e as leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) em fermentações mistas a 40°C em melaço suplementado com ART inicial de 20%.	111
5 CONCLUSÕES	114
REFERÊNCIAS	117
APENDICE	123
ANEXOS	129

1 Introdução

O grande desafio mundial atualmente é a procura por fontes alternativas de combustíveis do petróleo, pois este não é uma fonte de energia renovável, além de ser altamente poluente, e apresentar preços mais elevados que o etanol combustível. O bioetanol de cana-de-açúcar produzido no Brasil desde de 1931, vem ganhando maior espaço mundial como uma alternativa economicamente viável, com significativo potencial de expansão, sendo este uma fonte de energia renovável e sustentável sem grandes impactos ambientais (FARRELL et al., 2006). A grande vantagem deste combustível é que ele pode ser produzido em qualquer parte do mundo utilizando uma matéria prima local e tecnologia simples, como: no Brasil etanol produzido a partir da cana-de-açúcar e biodiesel a partir da soja e da mamona, no Canadá etanol produzido através do milho e arroz, e nos E.U.A etanol produzido através de sementes e forragens do milho (HERRERA, 2006).

Nos países em que há grandes reservas de petróleo e indústria petroquímica avançada, a obtenção do álcool é realizada através da via sintética a partir de hidrocarbonetos não saturados, como o eteno e etino, gases de petróleo e de hulha (tipo de carvão mineral que apresenta um teor de carbono entre 60% e 80%, utilizado na produção de hidrocarbonetos aromáticos). Mesmo que exista disponibilidade de derivados de petróleo que permitam a produção de álcool através da via sintética, a via fermentativa é o processo mais importante para obtenção de combustível alternativo, contribuindo para a redução dos impactos negativos gerados pela utilização de combustíveis fósseis em todo o mundo (CORDONA; SANCHEZ, 2007; LIMA; BASSO; AMORIN, 2001).

O etanol é um dos produtos de maior importância socioeconômica no Brasil e no mundo, já que este produto é muito utilizado em indústrias de alimentos e, como fonte de combustível ecologicamente correta. A produção de etanol em nosso país teve início com o uso de levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada na panificação. Assim, faz-se necessário conhecer as respostas das leveduras às diversas formas de estresse aos quais as células são submetidas (alcoólico, térmico, osmótico, jejum nutricional), definir o melhor processo e condições a serem utilizadas incluindo vantagens e desvantagens (AMORIN et al., 2011; ANDRIETTA et al., 2007).

Para se obter uma maior eficiência no processo de produção de etanol, novas tecnologias vem sendo pesquisadas e desenvolvidas dentro de universidades e no setor privado, sendo muitas vezes estes dois em parceria. Entre as áreas de maior interesse na

pesquisa são: o desenvolvimento de linhagens de leveduras melhoradas, contaminação com leveduras selvagens e bactérias, a variedade da cana-de-açúcar.

1.1 ETANOL: Importância na economia brasileira

O etanol é composto por dois átomos de carbono, cinco átomos de hidrogênio e uma hidroxila (C_2H_5OH), sendo obtido no Brasil pelo processo de fermentação do caldo de cana-de-açúcar e/ou mistura de caldo de cana e melaço. O etanol também pode ser produzido a partir de cereais, tubérculos como beterraba e mandioca, entre outros derivados agrícolas (UNICA, 2007).

A implementação do etanol no Brasil data do início do século XX, quando as primeiras tentativas para uso de álcool em veículos foram realizadas pela Secretaria Nacional de Agricultura. A ocorrência do desabastecimento de combustível devido a Primeira Guerra Mundial em território Europeu trouxe à partir de 1920 motivação para a realização de várias experiências por usinas nordestinas para produção de álcool como combustível. O álcool etílico ou etanol é usado no Brasil em larga escala como combustível: álcool hidratado comercializado via bombas específicas nos postos de abastecimentos, em veículos movidos exclusivamente a álcool e em veículos *Flex Fuel*, ou como álcool anidro em mistura obrigatória á gasolina (AMORIN et al., 2011; ANDRIETTA et al., 2007).

Desde seu lançamento, já foram comercializados 14,6 milhões veículos *Flex Fuel*, atribuindo uma participação de 83,4% dos veículos leves produzidos no mercado brasileiro no ano de 2011. Em setembro de 2012 foram licenciados 277 mil veículos leves, representando uma queda de 5,4% em relação a 2011, sendo que deste total, apenas 86,5% representam os carros *Flex Fuel*. Estes veículos geraram um aumento no consumo de álcool hidratado no Brasil (4,3 bilhões de litros em 2003 para 16,5 bilhões de litros em 2009). Montadoras brasileiras desenvolveram o primeiro modelo de motocicletas *Flex Fuel* (Honda CG 150 Titan MIX) em março de 2009. Desde 2005 a indústria aeronáutica Neiva, subsidiária da Embraer comercializa aviões agrícolas a álcool hidratado usado para pulverização de lavouras. Em outubro de 2007 ocorreu o lançamento do primeiro ônibus brasileiro movido a álcool. Em setembro de 2012 o setor automotivo brasileiro atingiu 17,7 milhões de veículos *flex-fuel* licenciados desde 2003 (BRASIL, 2011; BRASIL, 2012).

Segundo a União da Indústria da Cana-de-açúcar (Única, 2011), a projeção para moagem da cana-de-açúcar em 2012 seria 533,50 milhões de toneladas, uma redução de 6,16% em relação ao total estimado em março de 2011 (568,50 milhões de toneladas), e queda de 4,21% sobre o valor final da safra 2010/2011 (556,94 milhões de toneladas). Com base nesta projeção, estima-se que a produção de etanol para 2012 deve atingir 22,5 bilhões de litros, queda de 11,6% em relação ao número inicialmente projetado (25,51 bilhões de litros) e de 11,2% sobre os 25,4 bilhões de litros da safra anterior.

De acordo com o Ministério de Minas e Energias (BRASIL, 2012) a moagem do mês de setembro da safra 2012/13 registrou um atraso de 9,3% em relação à safra anterior, isto porque, em cinco meses da safra atual, foram processadas 389,5 milhões de toneladas de cana contra 429,5 milhões de toneladas de cana da safra anterior. Com esta menor disponibilidade de matéria prima acabamos produzindo 15,73 milhões de m³ de etanol, volume 10,7% menor do que o produzido no mesmo período da safra anterior com consequentemente queda na produção de açúcar de 9,5% (BRASIL, 2012). Isto se deve a redução no volume de cana disponível para a moagem, devido à idade avançada do canavial (o canavial mais velho possui baixo rendimento agrícola), a estiagem, o florescimento do canavial, doenças fúngicas e a geada.

Até setembro de 2012, foram consumidos 5,56 milhões de m³ de etanol anidro e 8,08 milhões de m³ de etanol hidratado, isto porque nos seis meses da safra 2012/13 (abril a setembro), foram consumidos 9,3 milhões de m³ de etanol combustível, retração de 10% em relação ao mesmo período da safra anterior. Com relação às exportações brasileiras de etanol até setembro de 2012, houve um aumento de 53% em relação ao mês anterior, fixando-se em 481,3 mil m³, representado por um aumento de 43% ao mesmo período do ano anterior, totalizando 1,8 milhões de m³, sendo que 64% das exportações teve como destino os Estados Unidos (244,8 mil m³) de forma direta (BRASIL, 2012).

1.2 FERMENTAÇÃO

1.2.1 Tipos de processos

A fermentação inicia-se logo que a levedura entra em contato com o mosto, podendo ser dividida em três fases: (1) fase preliminar ou pré-fermentação, onde se tem a adaptação das leveduras e multiplicação celular; (2) fase de fermentação, com

desprendimento abundante de gás (CO₂) e produção de álcool; e (3) fase de fermentação complementar ou pós-fermentação, onde se observa redução da atividade fermentativa (SHIMIDELL et al., 2001).

As operações industriais mais utilizadas nas destilarias brasileiras para produção de etanol:

I) Processo de fermentação em batelada alimentada – neste processo nutrientes são adicionados ao reator durante o cultivo sendo que o produto permanece no meio até o final da fermentação, ou seja, solução de nutrientes adicionada em intervalos constantes, enquanto que o fermentado é removido da dorna apenas no final do processo. A vantagem deste processo é que a repressão catabólica é suprimida ou diminuída pela alimentação intermitente do substrato (SHIMIDELL et al., 2001).

II) Processo de fermentação semi-contínuo - uma porção da cultura é coletada em intervalos de tempos enquanto meio fresco é adicionado ao sistema, havendo uma variação no volume da cultura dentro do reator. Este método apresenta algumas vantagens sobre as operações contínuas e de batelada, como: a) operação do reator por períodos longos sem a necessidade de um novo inóculo; b) aumento da produtividade apenas modificando o cronograma de trabalho. Como desvantagem, existe um alto risco de contaminação bacteriana e mutação de leveduras devido aos longos períodos de cultivos e as operações manuais, além de que, são necessários reatores de volumes maiores, levando a um maior investimento por parte das usinas (SHIMIDELL et al., 2001).

III) Processo de fermentação contínuo – adição de meio de cultura e inóculo (leite de levedura) de forma contínua nos reatores, concomitantemente com a saída da mesma quantidade de meio fermentado, sempre mantendo o volume de reação constante dentro do reator. Este processo também apresenta algumas vantagens sobre os processos anteriores, isto porque a otimização da alimentação pode levar a uma maior produtividade, com redução dos custos laboratoriais, uma vez que reduz o tempo ocioso e também evita o gasto de tempo com limpeza e sanitização das dornas. Existe neste processo a manutenção das células em um mesmo estado fisiológico, tornando-o uma excelente ferramenta para estudos de mecanismos de regulação metabólica ou ainda, para estudos de otimização da composição de meio de cultura. A grande desvantagem deste processo é que são mais vulneráveis a contaminantes e mutações genéticas espontâneas, resultando na seleção de mutantes menos produtivos, além de exigir um conhecimento maior quanto à otimização do processo para que o rendimento desejado seja atingido, principalmente, quanto à adição de

produtos químicos, variação no fluxo de alimentação e a mistura dos nutrientes (SHIMIDELL et al., 2001).

Nos últimos 30 anos os processos de fermentação foram melhorados para permitir que as destilarias Brasileiras apresentassem um rendimento fermentativo de 92-93% em relação aos registrados no início do programa “Proálcool” que era de 75-80%. A safra para produção de etanol no Brasil leva de 200 a 300 dias dependendo de vários fatores como variedade da cana, clima, demanda do mercado (AMORIN et al., 2011).

Segundo Amorin et al., (2011) 85% das destilarias Brasileiras operam em sistema de batelada alimentada e apenas 15% em processos de fermentação contínua, sendo estas fermentações realizadas com suco de cana (xarope), melaço diluído em água ou a misturas de ambos por um período de 6-12 horas, utilizando elevada concentração celular (8 – 15%, v/v de leveduras).

1.2.2 Estresses Fermentativos

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico, realizado principalmente por leveduras em nível citoplasmático, com o objetivo de produzir energia para possibilitar a realização de suas atividades fisiológicas, além de seu crescimento e reprodução. A transformação do açúcar em etanol e gás carbônico se dá através de reações sequenciais mediadas por enzimas, sendo denominada como via glicolítica. Essas enzimas glicolíticas podem sofrer intervenção de vários fatores (nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, pH, temperatura, entre outros) que influenciam na sua atividade, afetando assim, o desempenho do processo fermentativo (CECCATO-ANTONINI, 2008; PRETORIUS, 2000; QUEROL et al., 2003). As células de leveduras também são submetidas a diversas condições de estresse, sendo necessário o desenvolvimento de mecanismos moleculares de resistência a estas situações adversas. Qualquer fator do meio que possa vir a produzir um efeito adverso sobre o crescimento celular é considerado uma condição de estresse e a sobrevivência celular depende da sua capacidade em se adaptar rapidamente às mudanças que ocorrem no meio de cultivo (IVORRA; PEREZ-ORTIN; OLMO, 1999).

Estes estímulos podem ocorrer não só no ambiente do reator, mas também em ambientes naturais, podendo levar a mudanças estruturais e/ou alterações metabólicas nas leveduras, devido alterações na expressão de genes envolvidos na síntese de

compostos específicos (trealose e/ou proteína de choque térmico) que protegem o organismo (BANAT et al., 1998; FOLCH_MALLOL et al., 2004). Tanto os danos provocados pelo estresse quanto a resposta da levedura, dependem do tipo, do grau do estresse e da fase da levedura em seu ciclo de divisão celular no momento em que ocorre o estímulo. Para se defender destas situações desfavoráveis, a levedura responde rapidamente sintetizando moléculas que permitem aumentar o grau de reparo dos danos causados pelo estresse (BASSO et al., 2008; FOLCH-MALLOL et al., 2004).

A literatura indica o envolvimento da trealose e do ergosterol como agentes marcadores de estresse durante a fermentação alcoólica, sendo relatos de que a trealose está envolvida com o estresse etanólico e osmótico, enquanto que o ergosterol presente na membrana plasmática tem seu papel na tolerância ao etanol (QUEROL et al., 2003; ZHAO et al., 2009). Admite-se que a principal função da trealose seja a proteção das células durante o período de estresse e não como um carboidrato de reserva, isto devido a proteção exercida sobre os componentes do citosol quando a levedura encontra-se em condições desfavoráveis (MAHMUD et al., 2009; ROTH, 1970; THEVELIN, 1984; YEMM; WILLIS, 1954).

O glicerol é sintetizado como resposta a situações de estresse impostos as células durante o processo de fermentação, sendo dependente de vários fatores, como a linhagem selecionada, concentração do inóculo, concentração de bissulfito presente no mosto, concentração de açúcares, estresse osmótico, tipo de fonte de nitrogênio e sua concentração, pH, e aeração. O glicerol interno também contribui em condições anaeróbicas com a manutenção do balanço intracelular das células mantendo o balanço de oxirredução. Durante a formação do glicerol o excesso de NADH vindo da síntese de aminoácidos é convertido em NAD^+ , mas nos meios industriais esta fonte de nitrogênio é proveniente de peptídeos, aminoácidos livres e sais inorgânicos como sulfato de amônio (ALBERS et al., 1996).

1.2.2.1 Estresse osmótico

Segundo Basso, Basso e Rocha (2011) o estresse osmótico é frequentemente citado nos processos industriais, isto porque, na fermentação etanólica, as leveduras são expostas a concentrações elevadas de açúcar. Por outro lado, o estresse osmótico também pode ser causado por sais, que estão presentes em grandes quantidades no melaço de cana de açúcar, como elevados níveis de cálcio, potássio e magnésio.

O estresse osmótico se define como uma diminuição do potencial hídrico do ambiente no qual se está desenvolvendo um organismo, tendo como resposta imediata a saída de água intracelular, seguida de um processo adaptativo onde é necessário um tempo para que o equilíbrio osmótico entre as células seja atingido (FOLCH-MALLOL et al., 2004).

1.2.2.2 Estresse térmico

Segundo Rivera et al., (2006) pequenas mudanças de temperatura em um reator industrial afetam a cinética da fermentação, alterando a produtividade e a taxa de conversão de açúcar em etanol. A temperatura em um reator industrial normalmente varia de 33°C (durante a noite) a 35°C (no final do dia), isto em um sistema de fermentação com controle de temperatura.

A temperatura é umas das condições ambientais que mais afeta a levedura, durante a fermentação, alterando seu crescimento, metabolismo, capacidade fermentativa e a viabilidade celular. A temperatura ótima na fermentação alcoólica varia entre 26°C a 35°C, podendo alcançar 38°C dependendo do clima regional. Com o aumento da temperatura nos reatores, tem-se um aumento na velocidade da fermentação, favorecendo os contaminantes bacterianos e consequentemente deixando as leveduras mais sensíveis ao álcool levando desta maneira, a formação de metabólitos secundários como o glicerol (LIMA; BASSO; AMORIN, 2001).

1.2.2.3 Estresse etanólico

Sob o ponto fisiológico o etanol inibe o crescimento e a viabilidade celular por atuar negativamente sobre os sistemas de transportes (incluindo permeases de aminoácidos), sobre a sinalização celular da glicose e a atividade de enzimas chaves da via glicolítica (ALEXANDRE; CHARPENTIER, 1998).

Segundo Basso, Basso e Rocha (2011) o efeito inibitório do etanol sobre as leveduras ainda não é bem compreendido, porém sabe-se que a toxidez do etanol atua na membrana citoplasmática das células de levedura, alterando o grau de polaridade da membrana, causando interrupção do crescimento em concentrações elevadas e, ainda, aumentando a fluidez dela (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011; LLOYD et al., 1993; LYND et al., 1991). Além de afetar a composição da membrana, o etanol também

causa efeitos sobre a fermentação de leveduras, incluindo a inibição de crescimento e inativação enzimática, o que leva a uma diminuição da viabilidade celular (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

1.3 LEVEDURAS

1.3.1 Fisiologia da fermentação

As leveduras pertencem ao grupo Ascomicetos, denominados como fungos superiores, são organismos unicelulares, eucarióticos e heterotróficos, ou seja, são organismos com um alto grau de organização celular (Figura 1), contendo núcleo celular delimitado por uma membrana nuclear e organelas como mitocôndria (responsáveis pelo metabolismo energético da célula), vacúolos (reservatório de nutrientes, enzimas e produtos tóxicos), retículo endoplasmático e Complexo de Golgi. A parede celular apresenta uma estrutura rígida (constituída de 25% do peso da célula), que protege a célula além de conter várias enzimas. A morfologia celular das leveduras pode ser de forma esférica, elipsoidal ou cilíndrica. O tamanho e forma das células dependem das condições ambientais como temperatura, escassez de nutrientes e competição pelo substrato, sendo variável entre 1-5µm de largura e 5-12 µm de comprimento, apresentando normalmente maiores que as bactérias. (PELCZAR et al., 1980; WALKER, 1998).

Figura 1 - Representação da estrutura interna da célula de levedura gerando um broto.



Fonte: Biologia, (2011).

1.3.2 Metabolismo

As leveduras realizam a fermentação do açúcar para obter energia química (ATP) essencial para sua sobrevivência, seu crescimento, manutenção e multiplicação, sendo o etanol apenas um subproduto da fermentação. A obtenção do ATP se dá através da hidrólise dos açúcares (ex: sacarose) através de reações bioquímicas mediadas por enzimas no interior da célula. Parte do açúcar consumido durante a fermentação é desviado para crescimento celular, e para a formação de subprodutos, também conhecidos como produtos secundários da fermentação como glicerol, ácidos orgânicos, e álcoois superiores (AMORIN et al., 1989).

A levedura *S. cerevisiae* pode assimilar açúcares como a glicose, tanto por respiração ou fermentação, dependendo das condições da cultura e da disponibilidade do substrato e nutrientes disponíveis no meio ambiente (DARAMOLA; ZAMPRAKA, 2008).

O metabolismo nas leveduras é resultante de dois processos fundamentais: o catabolismo e o anabolismo. No caso das leveduras, o catabolismo pode ter a degradação do substrato produzindo etanol através da respiração e da fermentação. A respiração é um processo biológico onde o açúcar ($C_6H_{12}O_6$) é oxidado em CO_2 e H_2O , produzindo como saldo energético 38 moléculas de ATP, sendo este processo muito utilizado para multiplicação celular do fermento no início da safra. A fermentação alcoólica é constituída de reações em que o açúcar é parcialmente quebrado para formar etanol e CO_2 , resultando na produção de apenas duas moléculas de ATP. Portanto, esse processo não é eficaz para a multiplicação celular, mas é essencial na produção de etanol, indispensável na fabricação das bebidas alcoólicas, etanol combustível e pão. Durante o anabolismo, os microrganismos promovem a síntese de material celular (NOGUEIRA; VENTURINI-FILHO, 2005).

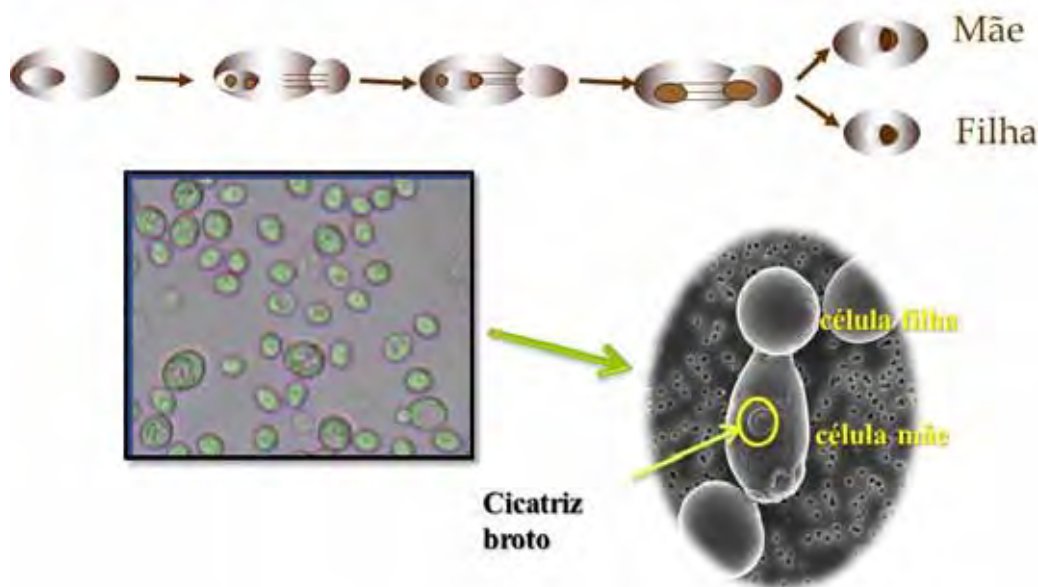
1.3.3 Reprodução

As leveduras do gênero *Saccharomyces* reproduzem assexuadamente (mitose) como observado na Figura 2 ou sexuadamente (meiose). Geralmente as leveduras se reproduzem por brotamento, em qualquer parte da célula (brotamento multilateral), apenas nos dois polos da célula (brotamento bipolar) ou ainda em um único polo das células (brotamento monopolar) (WALKER, 1998). Quando em meio de cultura com

disponibilidade de nutrientes, como nas fermentações industriais a reprodução é assexuada, ocorrendo através da multiplicação das leveduras por brotamento ou gemulação, originando células-filhas idênticas a célula mãe. Neste processo o núcleo da célula madura se desloca para membrana celular, originando uma gêmula (broto), sendo que este núcleo se alonga atingindo o broto. Assim que o broto atinge o tamanho da célula mãe, o núcleo se divide, originando a célula filha, que pode permanecer ou não ligada a células mãe, formando cadeias de células (MADRID et al., 1995; WALKER, 1998).

A reprodução sexuada (Figura 3) pode ocorrer quando as condições do meio de cultivo se tornam desfavoráveis, levando a formação de esporos no interior de cada célula (“*asci*”) (LALUCE, 1991; PRETORIUS, 2000; SOUZA et al., 2007). Nos fungos, essa forma de reprodução só acontece sob certas circunstâncias, como na escassez de alguns nutrientes, por exemplo, alguns fungos sentem que o ambiente deixou de ser propício para crescimento vegetativo e passam a realizar meiose que da origem a células haplóides capazes de se cruzarem ou hibridizarem (WALKER, 1998).

Figura 2 - Representação da reprodução assexuada (brotamento) da levedura *S. cerevisiae*.

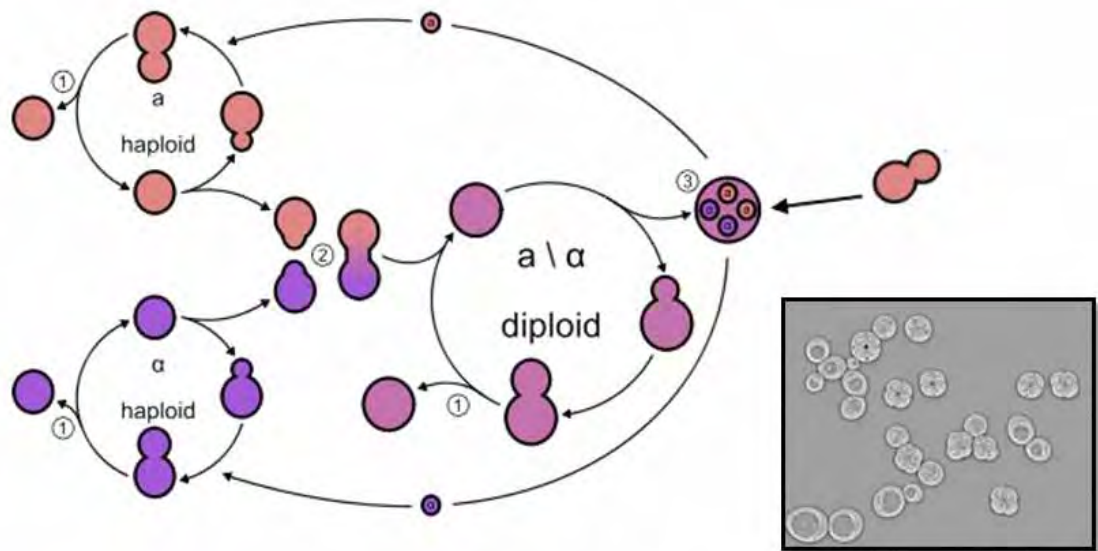


Fonte: Elaborada pela autora.

Segundo Ceccato-Antonini (2008) a mudança de ciclo assexuado para sexuado está correlacionada não somente com o estado nutricional (fontes de nitrogênio e carbono) e físico (necessidade de oxigênio) do ambiente, mas também com a presença de álcoois (produtos do catabolismo de aminoácidos) que se acumulam quando os

nutrientes são limitados. Dependendo das condições a levedura *S. cerevisiae* pode mudar de morfologia celular apresentando-se em forma filamentosa.

Figura 3 - Representação esquemática do ciclo celular da levedura *S. cerevisiae*.



Fonte: Wikilivros, (2011).

O que torna os fungos sexualmente distintos é seu tipo de cruzamento, denominados de tipo “a” ou “α” com base na reação de acasalamento, *mating-type* (FERREIRA, 2005).

1.3.4 Aplicações

A história do uso de leveduras pela humanidade é antiga, principalmente devido sua importância industrial que se estende além da fermentação tradicional, afetando outros setores comerciais, como ilustra a Figura 4.

Figura 4 – Diversidade de áreas que envolvem as leveduras na aplicação industrial e biotecnológica.

Fonte: adaptado de Walker, (1998).

A levedura *S. cerevisiae* é amplamente utilizada para conversão de açúcares dos diferentes substratos em vários produtos de interesse comercial através do processo de fermentação, como aqueles utilizados na indústria de alimentos para a produção de vinhos, cerveja, bioetanol e pão. *S. cerevisiae* também é utilizada em estudos de processos biotecnológicos como na indústria química (produção de enzimas, pigmentos, saborizante de alimentos e fonte de medicamentos) na indústria farmacêutica (vacinas, hormônios, probióticos e fatores sanguíneos por leveduras geneticamente modificadas), na tecnologia ambiental (controle biológico, biorremediação, utilização de subprodutos industriais e bioabsorção de metais), nas pesquisas biomédicas (metabolismo de drogas, doenças genéticas humanas, câncer e AIDS), além das pesquisas fundamentais nas áreas de biologia celular, bioquímica, genética molecular e biologia molecular. As fermentações clássicas são realizadas com reutilização de células da levedura *S. cerevisiae*, porque evitam os custos com a propagação do inóculo, os quais incluem consumo adicional de matéria prima e demanda de tempos mais longos de fermentação. Nas destilarias brasileiras, o excedente de biomassa é retirado antes do início de cada

novo ciclo de fermentação e utilizado no preparo de ração animal e/ou bagaço queimado para a geração de energia (CECCATO-ANTONINI, 2008; GUEIROS, 2006; LALUCE, 1991; PRETORIUS, 2000; SOUZA et al, 2007).

1.3.5 Reutilização de células na fermentação etanólica

A produção de etanol no Brasil é atualmente realizada pelo processo de fermentação em batelada alimentada ou contínua, com reciclo de células, de forma que contaminantes bacterianos também são reciclados e podem causar problemas devido à competição pelo mesmo substrato. O controle bacteriano é feito pela adição de ácido sulfúrico na lavagem das células do fermento ou utilização de biocidas (BASSO et al., 2008; MENEUGHIN et al., 2008).

Um reator biológico pode ser operado das seguintes formas: a) forma descontínua na qual o fermentador é reiniciado com um inóculo novo em cada batelada; b) sistema de cortes ou semi-contínuo, no qual uma parte do meio fermentado é retirado e trocado por meio novo; c) sistemas descontínuos alimentados, nos quais diversos reatores podem ser operados em paralelo; d) sistema contínuo, no qual todos os reatores participam de uma fermentação em cascata com ou sem reutilização de células (SCHIMIDELL et al., 2001). Atualmente o processo de reutilização de células pelas destilarias leva em torno de 200 a 300 dias dependendo de vários fatores, como: região de produção, condições meteorológicas, variedade da cana-de-açúcar e da demanda do mercado, onde estas células de leveduras são recicladas de 400 a 600 vezes durante a safra da cana que ocorre normalmente de abril a novembro no Brasil (AMORIN et al., 2011; ZARPELON; ANDRIETTA, 1992).

Durante os ciclos as células passam por inúmeras interferências externas oriundas do caldo, do ambiente e outras fontes, tornando-as vulneráveis a contaminação bacteriana e mesmo de leveduras selvagens, além de que também são expostas constantemente a condições estressantes como altas temperaturas e álcool, baixo pH, componentes inibitórios do melaço, metabólitos produzidos por bactérias, excesso ou deficiência de sais e minerais (AMORIN et al., 2011; BASSO et al., 2008; OLIVEIRA; PAGNOCCA, 1998). Nestes ciclos as células não podem ser apenas centrifugadas e adicionadas novamente aos reatores, é necessário que elas passem por um tratamento de descontaminação evitando assim a contaminação bacteriana, para iniciar a fermentação nas condições ótimas. Este tratamento consiste na incubação do leite de levedura em

água e ácido sulfúrico até pH 2,5 por aproximadamente 2 horas, para posteriormente iniciar uma nova fermentação (SOUZA et al., 2007).

A vantagem de realizar ciclos com células é que em vez das células converterem o açúcar em biomassa celular, mais açúcar será convertido em etanol do que nos outros processos sem reciclo de célula. Uma desvantagem pouco estudada em produção de etanol combustível é o surgimento de mutantes a medida que o processo continua sob condições de estresse (SOUZA et al., 2007).

1.3.6 Interações entre leveduras em cultivos mistos

Compreender os efeitos das associações entre os microrganismos é fundamental para realização dos processos de fermentação industrial, principalmente nas culturas mistas entre leveduras, como: i) interação entre leveduras; ii) condições da fermentação (tipo de processo, alimentação, temperatura); iii) atividade metabólica; iv) resistência a estresses (térmico, alcoólico); v) escassez de nutrientes e presença de inibidores (BASSO et al., 2008; DORTA et al., 2006).

É muito comum nas destilarias brasileiras iniciar o processo de fermentação com uma determinada levedura “*starter*” ou até duas cepas diferentes da levedura *S. cerevisiae*. Mas por não possuírem unidades de esterilização do mosto, as fermentações industriais são consideradas fermentações abertas, do ponto vista microbiológico, estando sujeitas a contaminações por bactérias e leveduras selvagens (*Saccharomyces* e espécies não *Saccharomyces*), resultando em competição pelo substrato com as cepas “*stater*” e os contaminantes (AMORIN et al., 2011; BASSO et al., 2008; BARRAJÓN et al., 2011).

Diferentes espécies de leveduras existem na matéria-prima (cana-de-açúcar), no solo e podem ser encontradas nas dornas de fermentação, sendo estas leveduras denominadas como selvagens, ou seja, levedura que não foi introduzida intencionalmente como inóculo do processo. Entre estas leveduras existem cepas capazes de sobreviver ao ambiente estressante da dorna, aumentando o rendimento fermentativo (AMORIN et al., 2011). As leveduras do gênero *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia*, *Dekerae* e *Schizosaccharomyces*, sobrevivem juntas no mesmo mosto com a levedura *Saccharomyces* por serem tolerantes ao etanol (FLEET; HEARD, 1993).

Os metabólitos excretados durante o processo de fermentação parecem ser um dos principais fatores para existência das interações entre os microrganismos, principalmente, nas culturas mistas entre leveduras, seja pelo aumento de um determinado produto (glicerol externo, acetaldeído e etanol) como pela assimilação do produto de um microrganismo por outro. As interações mais conhecidas entre as leveduras estão relacionadas com a diminuição ou aumento de acidez, aumentos em glicerol externo e modulação de sabores em bebidas fermentadas (FLEET, 2008).

2 Objetivos

Objetivo geral

O objetivo do trabalho inicialmente propostos consistia em ensaiar variações nos parâmetros de fermentação, além do acompanhamento da estabilidade genética das células da levedura IQAr/45-2 em ciclos sucessivos de fermentação em batelada. No entanto, estes objetivos tiveram que ser redirecionados, pois constatou-se que antes do estudo da estabilidade genética era preciso padronizar o processo de fermentação com reutilização de células e que as leveduras interagiam entre si nas fermentações industriais. Como resultado, os objetivos do presente trabalho consistiram em padronizar o processo de fermentação da levedura IQAr/45-2, bem como estudar as interações desta levedura com as leveduras industriais em altas temperaturas.

Objetivos específicos:

- a) padronização de uma metodologia de clarificação do melaço a ser utilizado nas fermentações;
- b) padronização do tempo de alimentação e do fluxo de alimentação dos reatores em escala de laboratório;
- c) otimização das condições de fermentação da levedura IQAr/45-2 em ciclos sucessivos com reutilização de células;
- d) comparação das leveduras em fermentações únicas pelo processo de batelada alimentada a 40°C;
- e) estudos das interações entre a levedura auxotrófica IQAr/45-2 e as leveduras industriais (PE-2, CAT-1, SA-1) em ciclos únicos de fermentação a 40°C.

Como, de um modo geral, esta temperatura limita a atividade fisiológica das leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, sendo então selecionada para criar condições de obtenção de maiores diferenças entre os resultados dos experimentos.

3 Materiais e Métodos

3.1 Leveduras:

Linhagens *S. cerevisiae* construída em nosso laboratório, da levedura IQAr/45-2 obtidos por Souza et al (1997).

Linhagens de leveduras industriais PE-2, CAT-1 e SA-1 gentilmente cedidas pelo Professor Doutor Luiz Carlos Basso da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ, Piracicaba-SP.

As culturas destas leveduras foram estocadas a -80°C em solução de glicerol 80% e também mantidas a 4°C em meio YPD solidificado. Culturas frescas destas leveduras foram utilizadas para realizar os experimentos.

3.2 Técnicas de Cultivo

3.2.1 Melaço

As amostras de melaço de cana-de-açúcar utilizadas na pesquisa foram gentilmente doadas pela Usina São Martinho localizada na Fazenda São Martinho em Pradópolis-SP.

Também utilizou-se melaço cedido pela Usina Zilor Engenharia e Alimento unidade São José e Biorigin em Macatuba-SP, que apresentava-se com as seguintes características: de 82 a 83°Brix e pureza de 66 a 68%.

3.2.1.1 Suplementação do Melaço

O melaço foi suplementado com 1,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂HPO₄ (di-amônio fosfato, DAP), 0,1 g.L⁻¹ de ZnSO₄.7 H₂O (sulfato de zinco) e 0,1 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O (sulfato de magnésio), como descrito na literatura (LIMA; BASSO; AMORIN, 2001; SILVA, 2010, MUKHTAR et al., 2010). A suplementação do melaço foi adotada apenas para os experimentos de fermentações.

3.2.1.2 Clarificação do melaço em escala de laboratório

Modificações no processo de clarificação do melaço foram realizadas com base em dados da literatura (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009; SGUAREZI *et al.*, 2009;). A

clarificação do melaço foi realizada inicialmente diluindo-se o melaço 2 vezes com água de torneira, seguido pelo ajuste do pH para 4,5 com H_2SO_4 6 mol.L⁻¹. Após, o melaço passou por aquecimento em vapor de autoclave a 100°C por 30 minutos. Terminado o aquecimento o caldo foi mantido em repouso por 48 horas em câmara fria (4°C), para flotação das partículas suspensas. O sobrenadante foi sifonado utilizando uma bomba à vácuo e Kitassato.

Como o trabalho foi realizado em condições estéreis, tornou-se necessário a centrifugação do melaço clarificado por 15 minutos à 4700 rpm, para diminuição da turvação presente (decantação dos microrganismos presentes no melaço, como bactérias e leveduras selvagens).

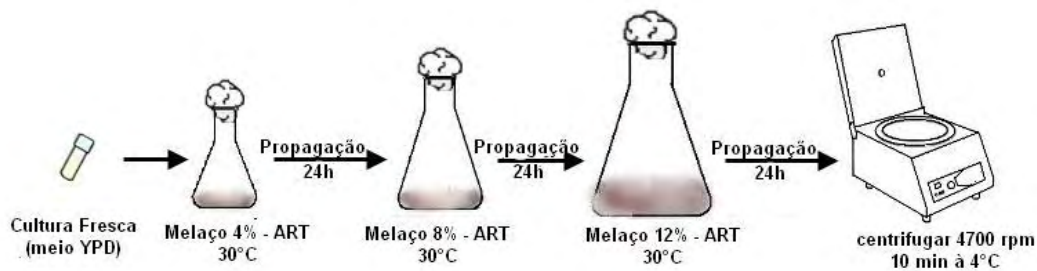
A clarificação do melaço foi acompanhada por medições de densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro (BIOESPECTRO SP-22) para avaliação da pigmentação, medidas de pH (pHmetro Marconi modelo PA200/P) e °Brix utilizando um refratômetro (Marca Biobrix) para medida dos sólidos suspensos.

3.2.2 Propagação do fermento em melaço em escala de laboratório

A obtenção do inóculo para os processos fermentativos das linhagens *S. cerevisiae* foram feitas de forma asséptica através de seus sucessivos cultivos nos meios formulados com melaço clarificado em frascos Erlenmeyers em três condições distintas, baseado em Schmidell et al., (2001):

Propagação I (cultivo estacionário em 3 etapas) - o pré-inóculo foi preparado com a inoculação de 2 alças de cultura pura e fresca da levedura desejada em 25 mL de melaço 4% em ART (m/v) contidas em Erlenmeyers de 125 mL. Este pré-inóculo foi mantido em repouso (BOD) por 24 horas à 30°C. Após este intervalo de tempo, este meio (25 mL de melaço 4% em ART) contendo a células foi vertido em um Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de melaço 16% em ART (m/v) de ART, atingindo um volume final de 50 mL de melaço 8% em ART (m/v) de ART. Esta suspensão foi novamente mantida em repouso em BOD por 24 horas à 30°C. Após às 24 horas de incubação, este meio (50 mL de melaço 8% em ART) contendo a células foi vertido um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de melaço 24% em ART (m/v) de ART, perfazendo um volume final de 100 mL de melaço 12% em ART (m/v) de ART. Esta suspensão foi mantida em repouso em BOD à 30°C por 12 horas, conforme ilustra a Figura 5.

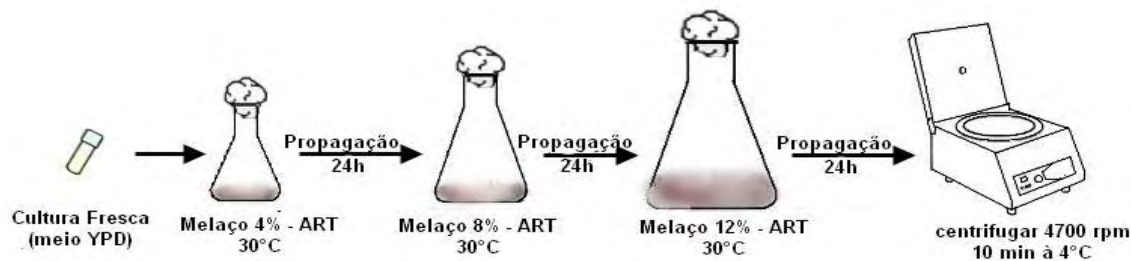
Figura 5 – Fluxograma da propagação do inoculo em três etapas crescentes de açúcar à 30°C em repouso (BOD).



Fonte: ¹ Elaborada pela autora.

- **Propagação II (em 3 etapas agitada)** - o pré-inóculo preparado com a inoculação de 2 alças de cultura pura e fresca da levedura desejada em 25 mL de melaço 4% em ART (m/v) de ART contidas em Erlenmeyers de 125 mL. Este pré-inóculo mantido sob baixa agitação em shaker (100 rpm) por 24 horas à 30°C. Após este intervalo de tempo, este meio (25 mL de melaço 4% em ART) contendo a células foi vertido para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de melaço 16% em ART (m/v) de ART, atingindo um volume final de 50 mL de melaço 8% em ART (m/v) de ART. Esta suspensão foi novamente mantida sob baixa agitação em shaker (100 rpm) à 30°C. Após as 24 horas de incubação, este meio (50 mL de melaço 8% em ART) contendo a células foi vertido um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de melaço 24% em ART (m/v) de ART, perfazendo um volume final de 100 mL de melaço 12% em ART (m/v) de ART. Esta suspensão foi novamente mantida sob agitação em shaker (100 rpm) à 30°C por 12 horas, conforme ilustra a Figura 6.

Figura 6 – Fluxograma de propagação do inoculo em três etapas crescentes de açúcar à 30°C sob agitação (100 rpm).

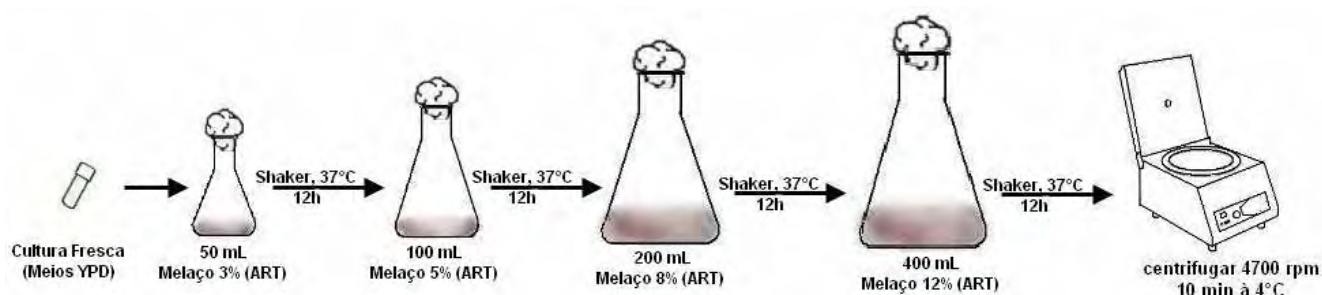


Fonte: ¹

¹ Figuras de 5-15, elaboradas pela autora.

- **Propagação III (4 etapas agitadas, 100 rpm)** - o pré-inóculo foi preparado com a inoculação de 2 alças de cultura pura e fresca da levedura desejada em 50 mL de melaço 3% em ART (m/v) de ART contidas em Erlenmeyers de 125 mL. Este pré-inóculo foi mantido sob agitação em shaker (100 rpm) por 12 horas à 37°C. Após este intervalo de tempo, este meio (50 mL de melaço 3% em ART) contendo as células foi vertido para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de melaço 10% em ART (m/v) de ART, atingindo um volume final de 100 mL de melaço 5% em ART (m/v) de ART. Esta suspensão foi mantida sob agitação em shaker (100 rpm) à 37°C. Após às 12 horas de incubação, este meio (100 mL de melaço 5% em ART) contendo a células foi vertido para um Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de melaço 16% em ART (m/v) de ART, perfazendo um volume final de 200 mL de melaço 8% em ART (m/v) de ART. Esta suspensão foi novamente mantida sob agitação em shaker (100 rpm) à 37°C. Após às 12 horas de incubação, as células contidas no erlenmeyer foram vertidas em outro Erlenmeyer de 1000 mL contendo 200 mL de melaço 24% em ART (m/v) de ART, perfazendo um volume final de 400 mL de melaço 12% (m/v) de ART, e incubado sob agitação à 37°C por 12 horas, conforme ilustra a Figura 7.

Figura 7 – Fluxograma de propagação do inoculo em quatro etapas crescentes de açúcar no melaço à 37°C.



Fonte: ¹

3.2.3 Preparo do leite de levedura

O leite de levedura consiste em uma suspensão concentrada de células. Após atingirem a concentração celular desejada para o cultivo, as células de leveduras foram coletadas por centrifugação (centrífuga refrigerada - Fanen) à 4700 x g à 4°C durante 10 minutos e re-suspensas em água deionizada estéril.

As células foram suspensas em água estéril para se obter uma suspensão de células da ordem de $15\text{-}30\text{ g.L}^{-1}$ (massa seca equivalente a 6%-12% em massa úmida, v/v) medidos por turbidimetria. O leite de levedura obtido desta maneira foi utilizado para inocular os mini-reatores.

3.2.4 Ativação ou estocagem do leite de levedura entre ciclos de fermentação

Ativação ou revitalização (indicada por crescimento ou manutenção em viabilidade), bem como a estocagem do mosto fermentado, ocorrem sem perdas de viabilidade e com pouco crescimento celular. Foram analisadas várias condições de estocagem das leveduras entre os ciclos de fermentação, acompanhadas por medidas de viabilidade e aumentos de biomassa. As melhores condições foram as seguintes:

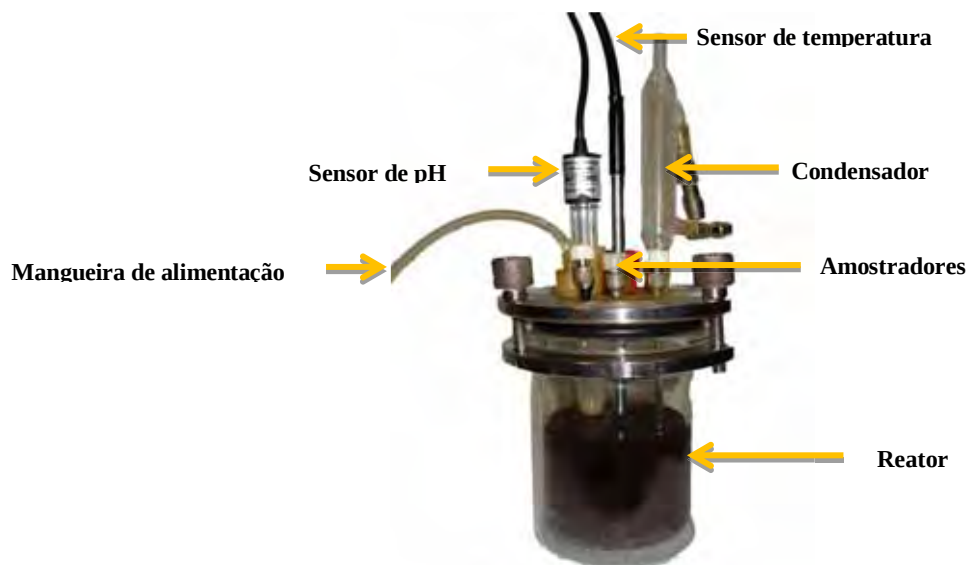
I) manter as células de levedura no próprio meio de fermentação à 4°C, sendo que no início do próximo ciclo de fermentação as células foram lavadas 3 vezes em água deionizada estéril e re-suspensas na concentração desejada para iniciar uma nova fermentação.

II) Células do leite de levedura foram coletadas do reator no final da fermentação por centrifugação e lavadas por três vezes em água deionizada estéril e re-suspensas em melaço 5% e 8% (ART) a pH 4,5, formando um volume final de 100 mL (solução + células). A suspensão celular foi ativada por incubação agitada (100 rpm) a 37°C por aproximadamente 15 horas.

3.2.5 Fermentações em batelada alimentada: únicas e sucessivas

As fermentações foram realizadas em batelada alimentada, conduzidas em um sistema composto por 4 mini-reatores de 200 mL de capacidade para um volume de trabalho de 100 mL (Marconi-SA, modelo MA5002/4/200, Piracicaba, SP), como demonstrado na Figura 8. Este sistema de fermentação é equipado com controles independentes para ajuste do pH (adição básica), agitador magnético e amostradores que podem ser operados independentemente e simultaneamente. Temperaturas foram controladas de acordo com cada tipo de fermentação, variando de 30°C à 42°C, através de água circulante proveniente de um banho-maria termostático. Uma coluna de resfriamento foi ligada a cada mini-reator e refrigerada por água circulante a 4°C, para evitar a evaporação do etanol.

Figura 8 - Mini-reator utilizado nas fermentações em batelada alimentada, com capacidade para 200 mL construído pela Marconi S.A. de Piracicaba (mod. MA502/4).



Fonte: ¹

Para padronização do tempo de alimentação dos fermentadores foi realizado um ciclo único de fermentação em batelada alimentada, utilizando uma bomba peristáltica (MasterFlex[®], modelo 7518-00, como na Figura 9) por 3 horas com um fluxo contínuo de aproximadamente $0,39 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e por 5 horas um fluxo contínuo de aproximadamente $0,23 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ de melaço em uma concentração em ART de 20% (em relação ao volume final de fermentação).

Figura 9 – Bomba peristáltica MasterFlex[®], modelo 7518-00 utilizada para alimentação dos fermentadores.



Fonte: ¹

3.3 Ensaios analíticos

Todas as medidas descritas abaixo foram feitas a partir da duplicata de amostras retiradas do leite de leveduras após a propagação, das soluções estoques padrões e dos reatores, onde se calculou a média e o desvio-padrão para cada uma destas medidas.

3.3.1 Medida de biomassa celular

A concentração de biomassa de todas as leveduras (IQAr/45-2, PE-2, CAT-1 e SA-1) foram determinadas por medidas de densidades óticas a 570nm usando-se um espectrofotômetro (Marca BIOESPECTRO SP-22), aos quais foram convertidas para massa seca de células através da correlação obtida por curvas de calibração (concentração de célula em g.L^{-1} x $A_{570\text{nm}}$) ver nas Figuras 10-13 no Apêndice A-D.

Procedimentos para obtenção do fator de conversão de massa úmida a massa seca: suspensões de cada linhagem de levedura em diferentes concentrações foram pipetadas em membranas de éster de celulose com 25 mm de diâmetro e 0,65 μm de diâmetro interno dos poros (Millipore, DAWP 02500) previamente pesadas, e em seguida lavadas com água miliQ. Depois de lavadas, as células foram secas sob luz infravermelha por 3 horas. As medidas das massas celulares foram realizadas em uma balança analítica após a secagem e resfriamento das células e a diferença entre a massa final e a massa inicial das membranas indicou a massa seca das células. Para medidas de turbidimetria foram utilizadas as mesmas diluições adotadas para pipetar nas membranas de éster de celulose, com a finalidade de se produzir uma curva analítica da absorbância medida em função da massa seca.

A equação obtida para a linhagem IQAr/45-2 mostrou um coeficiente angular $a = 1,895$ e coeficiente angular linear $= 0,0078$ (Figura 10 do Apêndice A). Substituindo-se os valores na equação da reta $y = ax + b$, obtém-se a seguinte relação:

$$y = 1,895 x + 0,0078 \quad (1)$$

Onde:

y = absorbância (nm)

x = biomassa seca (g.L^{-1})

Substituindo-se as variáveis na equação 1, obtém-se:

$$Abs = 1,895 \times biomassa \text{ g.L}^{-1} + 0,0078 \quad (2)$$

$$Biomassa \text{ g.L}^{-1} = \frac{Abs - 0,0078}{1,895} \times diluição \quad (3)$$

Equação da reta obtida para a linhagem industrial PE-2, mostrou um coeficiente angular $a = 1,531$ e coeficiente linear $b=0,0073$ (Figura 11 do Apêndice B). Substituindo-se os valores na equação da reta $y = ax + b$, obtém-se a seguinte relação:

$$y = 1,531 x + 0,0073 \quad (4)$$

Onde:

y = absorvância (nm)

x = biomassa seca (g.L^{-1})

Substituindo-se as variáveis na equação 4, obtém-se:

$$Abs = 1,531 \times biomassa \text{ g.L}^{-1} + 0,0073 \quad (5)$$

$$Biomassa \text{ g.L}^{-1} = \frac{Abs - 0,0073}{1,531} \times diluição \quad (6)$$

Equação da reta obtida para a linhagem industrial CAT-1, mostrou um coeficiente angular $a = 1,742$ e coeficiente linear $b=0,0809$ (Figura 12 do Apêndice C). Substituindo-se os valores na equação da reta $y = ax + b$, obtém-se a seguinte relação:

$$y = 1,742 x + 0,0809 \quad (7)$$

Onde:

y = absorvância (nm)

x = biomassa seca (g.L^{-1})

Substituindo-se as variáveis na equação 7, obtém-se:

$$Abs = 1,742 \times biomassa \text{ g.L}^{-1} + 0,0809 \quad (8)$$

$$Biomassa \text{ g.L}^{-1} = \frac{Abs - 0,0809}{1,742} \times diluição \quad (9)$$

Já, a equação da reta obtida para a linhagem industrial SA-1, mostrou um coeficiente angular $a = 1,535$ e coeficiente linear $b=0,0595$ (Figura 13 do Apêndice D). Substituindo-se os valores na equação da reta $y = ax + b$, obtém-se a seguinte relação:

$$y = 1,535 x + 0,0595 \quad (10)$$

Onde:

y = absorvância (nm)

x = biomassa seca (g.L^{-1})

Substituindo-se as variáveis na equação 10, obtém-se:

$$Abs = 1,535 \times \text{biomassa g.L}^{-1} + 0,0595 \quad (11)$$

$$\text{Biomassa g.L}^{-1} = \frac{Abs - 0,0595}{1,535} \times \text{diluição} \quad (12)$$

Os valores de biomassa para todas as linhagens de leveduras foram calculados em relação ao volume de meio no fermentador, no instante da amostragem e expressos em g.L⁻¹.

3.3.2 Viabilidade celular

A viabilidade foi determinada pelo método de azul de metileno (LEE et al., 1981), através da contagem celular ao microscópio óptico em câmara de Neubauer, onde as células com alta atividade fisiológica (viáveis) se mantinham incolores, enquanto as células não metabolizantes (mortas) incorporavam o corante azul apresentando-se azuis (Figura 14). A viabilidade foi obtida pela relação (em porcentagem) entre células viáveis e número total de células (vivas e mortas), de acordo com a equação:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de céls vivas}}{\text{N}^\circ \text{ de céls vivas} + \text{N}^\circ \text{ céls mortas}} \times 100$$

(ou)

$$\text{Viabilidade (\%)} = (\text{Número de células vivas} \div \text{Número total de células}) \times 100$$

Figura 14 - Determinação da viabilidade celular de leveduras com azul de metileno. As células coradas de azul são células mortas enquanto as incolores são células viáveis.



Fonte: ¹

Composição do azul de metileno (g.L^{-1}):

Glicose	10 g
KCl	0,42 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,48 g
NaHCO_3	0,2 g
NaCl	9,0 g
Azul de metileno	0,25 g
Água deionizada q.s.p	1L

Procedimento: suspensão de células foi diluída em reagente de azul de metileno e após 5 minutos foram feitas as contagens das células utilizando uma câmara de Neubauer espelhada e microscópio ótico comum com aumento de 40x (Microscópio Carl Zeiss, West Germany).

3.3.3 Dosagem de etanol

A concentração do etanol foi determinada nos sobrenadantes das culturas separados por centrifugação a $10.400 \times g$ a 4°C , utilizando um cromatógrafo gasoso com um detector de ionização de chama e usando uma coluna empacotada PAD/2499 (modelo CG-37; Instrumentos Científicos, São Paulo, Brasil). Os valores de etanol obtidos foram expressos em % (v/v). A calibração do equipamento foi realizado através de soluções padrões de etanol nas respectivas concentrações 0,5% e 1,0% (v/v).

Procedimento: o sobrenadante das culturas foram separados por centrifugação a 10.400 rpm a 4°C por 3 minutos (centrífuga Sorvall, Legend Mach 1.6R, Thermo) e o pellet celular descartado e o sobrenadante armazenado a -4°C para posterior análise. O sobrenadante foi diluído 10 vezes em água destilada e 4 μL deste diluído foi injetado ao cromatógrafo para se determinar a concentração de etanol nas amostras em função do tempo de retenção.

3.3.4 Açúcar residual total (ART)

O açúcar residual foi determinado utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1959) e expresso em ART (g.L^{-1} de açúcar redutor total)

após a hidrólise da sacarose. Uma curva padrão foi obtida, com o uso do espectrofotômetro BIOESPECTRO Visível (SP-22), destinada a correlacionar a concentração de glicose e absorbância dos hidrolisados (Figura 15 no Apêndice E). A equação obtida da curva padrão mostrou um coeficiente angular $a = 28,74$ e coeficiente linear $b = -0,098$, onde substituindo os valores na equação da reta $y = ax + b$, obtém-se a seguinte relação:

$$y = 2874x - 0,098 \quad (13)$$

Onde:

y = absorbância (nm)

x = açúcares redutores totais (%)

Substituindo-se as variáveis na equação 13, obtém-se:

$$Abs = 28,74 \times ART \% - 0,098 \quad (14)$$

$$ART (\%) = \frac{Abs + 0,098}{28,74} \times \text{dilução} \quad (15)$$

Composição do reagente DNS (g/100mL):

Ácido 3,5-dinitrossalicílico	1,0 g
Tartarato de sódio potássio	30,0 g
NaOH	1,6 g
Água destilada q.s.p	100 mL

Procedimento: o sobrenadante das culturas foram separados por centrifugação a 10400 rpm a 4°C por 3 minutos (centrífuga Sorvall, Legend Mach 1.6R, Thermo) e o pellet celular descartado e o sobrenadante armazenado a -4°C para posterior análise.

A mistura de reação (1,0 mL) foi desenvolvida com a adição de 0,8 mL de amostra (sobrenadante de cultura) mais água destilada e acrescido de 0,2 mL de solução de HCl 6 mol.L⁻¹ em tubos de ensaio. Em seguida, estes tubos foram incubados a 60°C durante 7 min para hidrólise do açúcar. A reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de NaOH 2,4 mol.L⁻¹. A reação colorimétrica ocorreu com a adição de 2,0 mL do reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico, seguido por aquecimento a 100°C durante 5 minutos em banho de água fervente. As leituras foram feitas no espectrofotômetro BIOESPECTRO SP22 a 546 nm.

3.3.5 Proteína Total

A proteína total foi determinada pelo método do Biureto (ROBYT; WHITE, 1987), através da obtenção de uma curva padrão de uma solução de soro-albumina 1,0% correlacionando a absorbância com a concentração de proteínas de acordo com Coradello (2012), ver curva padrão na Figura 16 do Anexo A. A equação da reta mostrou um coeficiente angular $a=0,751$ e coeficiente linear $b=-0,045$, substituindo os valores na equação da reta $y = ax + b$, obtém-se a seguinte relação:

$$y = 0,751x + 0,045 \quad (16)$$

Onde:

y = absorbância (nm)

x = proteína total (%)

Substituindo-se as variáveis na equação 16, obtém-se:

$$Abs = 0,751 \times \text{proteína (\%)} - 0,045 \quad (17)$$

$$\text{Proteína (\%)} = \frac{Abs - 0,045}{0,751} \times \text{diluição} \quad (18)$$

Os valores de proteína obtidos através da equação (18) foram expressos em $\mu\text{g}_{\text{proteína}} \cdot \text{mg}_{\text{células}}^{-1}$.

Composição do reagente de Biureto (g.100mL):

CuSO ₄ .5H ₂ O	0,3 g
Tartarato de sódio e potássio	0,9 g
NaOH 0,2N	50 mL
KI	0,5 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Procedimento: O processo de extração da proteína total foi realizado com uma quantidade de 100 mg (massa seca) de células de levedura que foram re-suspensas em 1,0 mL de solução tampão de extração Tris/HCl 0,01 M, pH 7,2 e adicionados em um tubo de vidro com parede espessa de 5 mL contendo 1,0 g de micro-esferas de vidro (0,05mm de diâmetro) a 4 °C. Em seguida, os tubos foram congelados a -20 °C. As células foram rompidas em um agitador de tubos (Marca VELP, modelo Zx3) durante 4 ciclos de agitação de 30 segundos e permanência em banho de gelo por 30 segundos nos intervalos entre as agitações. As micro-esferas de vidro e as células

foram separadas por centrifugação em Eppendorf a $10.400 \times g$ por 3 minuto a 4°C . Em seguida, as proteínas coaguladas foram separadas por centrifugação a $10.400 \times g$ por 5 minuto a 4°C . A mistura da reação (sobrenadante + reagente de Biureto) foi a seguinte: 2,0 mL de amostra acrescidos de 3,0 mL do reagente de Biureto. A mistura da reação foi incubada por 10 minuto a 37°C . As leituras de absorbância foram feitas a 540 nm.

3.3.6 Trealose Intracelular

A dosagem da trealose intracelular foi realizada através do método de Antrona (MAHMUD et al., 2009; ROTH, 1970; YEMM; WILLIS 1954). Uma curva padrão de glicose $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi obtida para relacionar a absorbância com a concentração de glicose de acordo com Coradello (2012), ver curva padrão na Figura 17 do Anexo B. A equação da reta obtida mostrou um coeficiente angular $a=0,030$ e coeficiente linear $b=-0,009$, onde substituindo os valores na equação da reta $y = ax + b$, obtém-se a seguinte relação:

$$y = 0,030x - 0,009 \quad (19)$$

Onde:

y = absorbância (nm)

x = glicose ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

Substituindo-se as variáveis na equação 19, obtém-se:

$$\text{Abs} = 0,030 \times \text{glicose} (\mu\text{g.mL}^{-1}) - 0,009 \quad (20)$$

$$\text{Glicose} (\mu\text{g.mL}^{-1}) = \frac{\text{Abs} + 0,009}{0,030} \times \text{diluição} \quad (21)$$

Os valores de glicose obtidos através da equação (21) foram convertidos em trealose por meio da correlação entre seus respectivos pesos moleculares (PM), onde 1 molécula de trealose (PM = 342,23) é formada por 2 moléculas de glicose (PM = 180,16), sendo os valores expressos em $\mu\text{g}_{\text{trealose}} \cdot \text{mg}_{\text{células}}^{-1}$.

Composição do reagente de antrona:

Antrona	40 mg
H ₂ SO ₄ 95%	20 mL
Água destilada q.s.p	1 mL

Adicionou-se 40 mg de antrona a 1 mL de água destilada, seguido pela adição de 20 mL de H₂SO₄ 95%. Este reagente deve ser preparado na hora do uso, e mantido sob resfriamento durante a manipulação.

Procedimento: uma suspensão contendo 100 mg de células foi centrifugada a 10.400 rpm a 4°C por 3 minutos (centrífuga Sorvall, Legend Mach 1.6R, Thermo) e o pellet celular formado foi lavado por 2 vezes em água miliQ. Reservou-se apenas o pellet celular que foi utilizado para a extração da trealose através de uma solução de ácido tricloroacético (0,2 mL de TCA) 0,5 mol.L⁻¹ mantidos a temperatura ambiente por 40 minutos (repetir operação 2 vezes). O sobrenadante foi separado novamente por centrifugação a 10400 rpm, 4°C por 3 minutos. Os sobrenadantes resultantes das duas extrações foram reunidos para realização do ensaio colorimétrico com leitura na faixa de 620 nm.

3.3.7 Medidas de glicerol interno

O glicerol interno foi determinado por meio de uma reação enzimático, utilizando o Kit enzimático de Triglicérides GPO Trinder (Laborclin, lote n: 10415006). Uma curva padrão de glicerol 0,208 mg.mL⁻¹ foi obtida para relacionar a absorbância com a concentração de glicerol de acordo com Coradello (2012) , ver curva padrão na Figura 18 do Anexo C.

A equação da reta obtida mostrou um coeficiente angular a=92,17 e coeficiente linear b=-0,001, onde substituindo os valores na equação da reta $y = ax + b$, obtém-se a seguinte relação:

$$y = 92,17x - 0,001 \quad (22)$$

Onde:

y = absorbância (nm)

x = glicerol (mg.mL⁻¹)

Substituindo-se as variáveis na equação 22, obtém-se:

$$Abs = 92,17 \times \text{glicerol (mg.mL}^{-1}) - 0,001 \quad (23)$$

$$\text{Glicerol (mg.mL}^{-1}) = \frac{Abs + 0,001}{92,17} \times \text{diluição} \quad (24)$$

Os valores de glicerol obtidos através da equação (24) foram expressos em $\mu\text{g}_{\text{glicerol}} \cdot \text{mg}_{\text{células}}^{-1}$.

Procedimento: o processo de extração do glicerol interno é semelhante ao da proteína total, onde 100 mg de células são suspensas em tampão Tris/HCL 0,01 M a pH 7,2 e lise celular induzida através de alta agitação. A reação colorimétrica (sobrenadante + reagente de trabalho do kit enzimático) foi incubada por 10 minutos a 37 °C. As leituras das absorbâncias foram feitas a 500 nm. Para reação foi utilizado o Kit comercial Triglicérides GPO Trinder (Cod. 743191, Lot. 10614038) marca Laborclin.

3.3.8 Medidas de pH

Foram obtidas leituras com o uso de um pHmetro digital da Marconi modelo MA PA200/P.

3.4 Meios de culturas diferenciais

Os meios diferenciais são muito cobiçados e importantes no acompanhamento do processo industrial para detecção de mutantes e contaminantes, uma vez que são utilizados na identificação e quantificação de microrganismos principalmente por variações em coloração, forma e tamanho das colônias resultante de corantes ou deficiências nutricionais dos meios.

3.4.1 Preparo dos meios

Os corantes utilizados foram esterilizados por filtração em membrana éster de celulose (filtro de 0,22 μM e de procedência MILLIPORE GSWP02500) e depois adicionados aos meios.

Os meios de cultura foram preparados 2 a 7 dias antes da sua utilização e durante este período eles foram conservados em geladeira a 7°C, envolvidos por plástico filme e armazenados em sacos plásticos hermeticamente fechados sob o abrigo da luz. As colônias foram ampliadas com auxílio de um Esteroscópio (marca Tecnal modelo SQZ), e para captura das fotos utilizamos uma máquina fotográfica (Marca Nikon Coolpix L5).

Para confirmar se as colônias obtidas após crescimento eram de leveduras ou bactérias utilizamos um microscópio (Marca Olympus CBA) com um aumento de 1.000 vezes para levedura e utilizando com óleo de imersão para visualização de bactérias.

A população de células das amostras foram plaqueadas nos seguintes meios:

a) Meio YPD - é um meio rico, recomendado por Sherman e Hicks (1999) para crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.

A composição do meio (% p.v⁻¹):

Extrato de levedura	1%
Peptona	2%
Glicose	2%
Ágar	2% (em meio sólido)

Procedimento: todos os componentes químicos foram misturados em água destilada e esterilizados em autoclave por 20 min. a 121°C. Após a esterilização, os meios foram vertidos em placas de Petri 90 x 15 cm.

b) Meio Nagai (1963) – utilizado para isolamento de variantes morfológicas. Este meio permite observar a variabilidade genética das colônias, devido o crescimento de colônias com diferentes tamanhos e colorações.

A composição do meio (% p.v⁻¹):

KH ₂ PO ₄	0,15%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,15%
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,2 %
Peptona	0,15%
Extrato de levedura	0,15%
Glicose	2%
Agar	1,2 %
Eosina	8-15 mg/L
Azul de Tripiano	15-20 mg/L

Procedimento: esterilizou-se o meio basal contendo Agar suspenso, extrato de levedura e peptona em autoclave à 121°C por 20 min a 1 atm. e, em seguida, adicionar os

volumes necessários das soluções de glicose, KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ bem como a solução de corantes.

c) Meio WLN - recomendado para isolamento seletivo e enumeração de microrganismos encontrados em indústrias de fermentação e cervejarias. Foi utilizado o meio comercial Himedia (M115-500g, Lot. 0000075378).

A composição do meio (% p.v⁻¹):

Caseína enzimática hidrolisada	0,5%
Extrato de Levedura	0,4%
Glicose	5,0%
Fosfato monopotássico	0,055%
Cloreto de potássio	0,0425%
Cloreto de cálcio	0,0125%
Sulfato de magnésio	0,0125%
Cloreto férrico	0,00025%
Sulfato de manganês	0,00025%
Verde Bromocresol	0,0022%
Ágar	2%

Procedimento: todos os componentes foram misturados em água miliQ (18,3 pureza) e esterilizados em autoclave por 20 min. a 121°C. após a esterilização o meios for vertido em placas de Petri.

3.5 Tratamento Estatístico (CALLEGARI-JACQUES, 2003)

Os testes estatísticos são utilizados em pesquisas para comparar condições experimentais, pois estes testes validam os resultados, permitindo uma maior confiabilidade.

Segundo Callegari-Jacques (2003), o Teste *Student* (*t*) consiste em formular uma hipótese nula ou alternativa, e aplicá-lo à função de probabilidade (p-valor) da distribuição normal dos valores, onde $P < 0,05$ indica médias estatisticamente diferentes, enquanto $P \geq 0,05$ indica que as médias são estatisticamente equivalentes. O teste-*F* foi aplicado antes do teste *t* para analisar a variância das médias, utilizando um nível de significância de 0,05 ($\alpha=0,05$).

O Qui-Quadrado (χ^2) também chamados por testes de distribuição livre foi aplicado para valores em viabilidade utilizando um nível de significância de 0,05.

Os experimentos foram realizados em duplicata, obtendo uma média e desvio padrões para cada tempo. Adotamos nível de significância de 0,05 ($\alpha=0,05$), podendo assim afirmar que a hipótese nula é rejeitada como nível de confiança de 95%. Para realizar os testes estatísticos foi utilizado o programa Excel (2007).

Os gráficos obtidos neste trabalho foram plotados no software OringinPro 8.00 (Oringin Lab Corporation).

3.6 Cálculos dos Parâmetros cinéticos da fermentação (HISS, 2001; RIVERA et al., 2006)

Os estudos cinéticos de uma fermentação tem como objetivo a análise da velocidade de transformação do substrato em produto e em material celular em função do tempo de fermentação.

3.6.1 Velocidades específicas de transformação

Os dados coletados a partir dos ensaios fermentativos foram utilizados para calcular as velocidades específicas de crescimento celular (μ_x – Equação 25), formação de produto (μ_p , Equação 26) como mostrado abaixo. Para tal, foram utilizados os softwares Origin 8.0 e Microsoft Excel 2007.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \bullet \frac{dX}{dt} \quad (25)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \bullet \frac{dP}{dt} \quad (26)$$

3.6.2 Fator de conversão de substrato a células

O fator de conversão do substrato em células ($Y_{x/s}$) fornece a quantidade celular produzida por grama de açúcar consumido. Este parâmetro expressa a quantidade de massa células produzida por grama de açúcar consumido, sendo calculado pela Equação 27:

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (27)$$

Onde:

X_0 = concentração celular inicial

X = concentração celular no instante t

S_0 = concentração inicial do substrato

S = concentração residual do substrato no instante t

3.6.3 Fator de Conversão do Substrato em Produto ($Y_{P/S}$)

O fator de conversão do substrato em produto ($Y_{P/S}$) foi calculado como ilustra a Equação 28, abaixo:

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_f - S_0} \quad (28)$$

Onde:

P_f = concentração final de etanol (g.L^{-1});

P_0 = concentração inicial de etanol (g.L^{-1});

S_f = concentração de açúcar final (g.L^{-1});

S_0 = concentração inicial de açúcar (g.L^{-1});

$Y_{P/S}$ (rendimento em produto) = quantidade de produto formado em relação à quantidade de substrato limitante consumido.

3.6.4 Produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

A produtividade das fermentações foi calculada, utilizando-se os valores de etanol produzido em (g.L^{-1}) e o tempo total de fermentação (h), segundo a Equação 29, uma vez que este parâmetro possibilita o cálculo da velocidade de transformação do açúcar em etanol, sendo que quanto maior o valor melhor a levedura para o processo:

$$\text{Pro} = \frac{P_F - P_0}{T_F} \quad (29)$$

Onde:

P_0 = Etanol inicial;

P_F = Etanol final;

T_F = Tempo total de fermentação;

Pro= produtividade.

3.6.5 Rendimento etanólico

O rendimento fermentativo baseia-se na estequiometria da fermentação etanólica, utilizando-se os valores de etanol produzido (g.L^{-1}) e dos ART no caldo (g.L^{-1}), pela Equação 30:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{P_F}{S_0 \times 0,511} \bullet 100 \quad (30)$$

Onde:

P_F = Etanol final;

S_0 = concentração inicial de açúcar (g.L^{-1}).

4 Resultados e Discussões

Os resultados obtidos durante a coleta de dados estão descritos em tópicos que aparecem ao longo do texto a seguir.

4.1 ESCOLHA DO MÉTODO PARA CLARIFICAÇÃO DO MELAÇO

As impurezas existentes no caldo da cana fizeram surgir nas usinas e destilarias equipamentos capazes de fazer um tratamento deste o caldo de cana ou xarope para retirada destas partículas insolúveis (como areia, argila, bagacilho, etc...), tratadas através do peneiramento e das impurezas solúveis através do tratamento com produtos químicos. Essas impurezas acabam por saturar o processo de fabricação de álcool, pois compromete a qualidade do produto final, além de prejudicar o funcionamento dos decantadores, podendo até chegar a paradas e onde se perde álcool (BASSETTO, 2006).

A clarificação do caldo de cana realizada logo após a moagem tem como objetivo remover as impurezas do caldo através da adição de agentes químicos, para coagular parte da matéria coloidal (ceras, graxas, proteínas, gomas, pectinas, corantes), precipitar certas impurezas (silicatos, sulfatos, ácidos orgânicos). Forma-se um precipitado insolúvel que é eliminado por posterior decantação e filtração.

Os experimentos foram realizados com decantação do melaço tratado a 30°C (Tabela 1) e 4°C (Tabela 2).

A Tabela 1 mostra os efeitos do tempo de decantação do melaço deixado em repouso por diferentes tempos em BOD à 30°C após o aquecimento em autoclave (à 100°C por 30 min.) para decantação das partículas insolúveis.

Tabela 1 – Efeito do pH inicial ajustado com ácido sulfúrico ou adição de fosfato antes do aquecimento (100°C por 30 min) em vapor de autoclave e tempo de decantação do melaço **em BOD a 30°C**.

Procedimentos		Medidas de Variáveis no da decantação		
Aditivos adicionados ao melaço para ajuste do pH	Tempo de decantação	pH	°Brix	Abs _{600 nm} ^(b)
Controle^(c) (sem adições)	Controle^(a)	5,29	43,50°	0,700 (100%)
	24 hs	5,08	42,50°	0,560 (20%)
	36 hs	5,11	42,50°	0,587 (16,1%)
	48 hs	5,11	43,00°	0,587 (16,4%)
Adição de NaH₂PO₄ · H₂O (1,5 g.L⁻¹, pH 5,0)	Controle^(a)	5,28	43,25°	0,693 (1%)
	24 hs	5,08	42,75°	0,567 (19%)
	36 hs	5,12	43,50°	0,567 (19%)
	48 hs	5,12	43,50°	0,567 (19%)
Adição de H₂SO₄ (pH 3,0)	Controle^(a)	3,00	42,50°	0,627 (10,4%)
	24 hs	2,90	42,50°	0,753 (7,6%)
	36 hs	2,92	42,75°	0,767 (9,6%)
	48 hs	2,93	44,00°	0,747 (6,7%)
Adição de H₂SO₄ (pH 4,5)	Controle^(a)	4,5	43,75°	0,640 (8,6%)
	24 hs	4,41	42,00°	0,593 (15,3%)
	36 hs	4,45	43,50°	0,593 (15,3%)
	48 hs	4,45	42,50°	0,587 (16,1%)
Adição de H₂SO₄ (pH 5,0)	Controle^(a)	5,0	43,00°	0,680 (2,8%)
	24 hs	4,82	40,25°	0,593 (15,3%)
	36 hs	4,88	42,50°	0,580 (17,1%)
	48 hs	4,86	43,25°	0,593 (15,3%)

^(a) Controle medidas antes do tratamento por vapor em autoclave por 30 min. a 100°C.

^(b) Absorbâncias a 600 nm em amostras do melaço clarificado diluídas 15x; **Valores relativos no final da clarificação:** em relação ao controle sem aditivos e ajuste de pH, considerado como 100%.

Fonte: ²Elaborada pela autora.

² Tabelas de 1-18, elaboradas pela autora.

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos com os diferentes tratamentos realizados com o melaço (adição de ácido sulfúrico, fosfato mono hidratado de sódio) seguido por decantação em BOD à 30°C em diferentes tempos. Absorbâncias a 600 nm do melaço clarificado foram determinadas considerando-se 100% a absorbância do experimento controle sem adição de ácido sulfúrico e fosfato. Os resultados mostram que tratamento com ácido sulfúrico quando em pH 4,5 e/ou 5,0 foram eficazes para remoção de cor do melaço. Os melhores tratamentos para o melaço consistem no seguinte: adição de H₂SO₄ (pH 4,5) sob incubação por 48 horas, ou adição de 1,5 g.L⁻¹ de fosfato mono hidratado de sódio, uma vez, que eles levaram a uma maior remoção de melanóides (respectivamente de 16,1% e 19%).

A condição na qual se adicionou ácido sulfúrico até pH 4,5 foi a selecionada pelas seguintes razões: a) o pH não variou; b) menor variação em °Brix; e c) maior eliminação de pigmentos melanóides pela medida de absorbância a 600 nm.

A Tabela 2 mostra os efeitos do tempo de decantação do melaço em repouso nos diferentes tempos (24, 36 e 48 h) em câmara fria à 4°C após o aquecimento em autoclave, para decantação das partículas insolúveis.

Tabela 2 – Efeito do pH inicial ajustado com ácido sulfúrico ou adição de fosfato antes do aquecimento (100°C por 30 min) em vapor de autoclave e tempo de decantação do melaço em câmara fria a 4°C.

Procedimentos		Medidas das Variáveis durante a decantação		
Aditivos adicionados ao melaço para ajuste do pH	Tempo de decantação	pH	°Brix	Abs _{600 nm} ^(b)
Controle (sem adições)	Controle ^(a)	5,12	43,50°	0,608 (100%)
	24 hs	5,09	43,50°	0,486 (20,1%)
	36 hs	5,19	43,00°	0,479 (21,2%)
	48 hs	5,13	43,75°	0,484 (20,4%)
Adição de NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (1,5 g/L ⁻¹ , pH 5,0)	Controle ^(a)	5,13	40,75°	0,556 (8,5%)
	24 hs	5,09	38,25°	0,443 (27,1%)
	36 hs	5,21	40,75°	0,439 (27,8%)
	48 hs	5,11	40,50°	0,438 (27,9%)
Adição de H ₂ SO ₄ (pH 3,0)	Controle ^(a)	3,10	41°	0,509 (16,3%)
	24 hs	3,07	41,75°	0,542 (10,8%)
	36 hs	3,14	40,75°	0,558 (8,2%)
	48 hs	3,11	42,75°	0,557 (8,4%)
Adição de H ₂ SO ₄ (pH 4,5)	Controle ^(a)	4,5	39,25°	0,527 (13,3%)
	24 hs	4,45	40,00°	0,439 (27,8%)
	36 hs	4,63	39,25°	0,432 (28,9%)
	48 hs	4,55	40,75°	0,418 (31,2%)
Adição de H ₂ SO ₄ (pH 5,0)	Controle ^(a)	5,0	38,50°	0,490 (19,4%)
	24 hs	4,92	39,75°	0,435 (28,4%)
	36 hs	5,08	40,25°	0,433 (28,8%)
	48 hs	5,00	40,00°	0,427 (29,7%)

^(a) Controle medidas antes do tratamento por vapor em autoclave por 30 min. a 100°C.

^(b) Absorbâncias a 600 nm em amostras do melaço clarificado diluídas 15x; **Valores relativos no final da clarificação:** em relação ao controle sem aditivos e ajuste de pH, considerado como 100%.

Fonte: ²

A Tabela 2 descreve os resultados obtidos com os diferentes tratamentos realizados ao melaço (ácido sulfúrico, fosfato mono hidratado de sódio e sem adição de ácido ou sal) deixado em repouso na câmara fria à 4°C por diferentes tempos. A densidade óptica (DO) da solução de melaço obtida pela leitura de absorbância do experimento controle sem o pré-tratamento foi 0,608 (considera-se 100%). Os resultados obtidos mostram que tratamento com ácido sulfúrico em pH 4,5 e/ou 5,0

foram eficazes para remoção de cor do melaço, levando a uma redução de 31,2% e 29,8%. A adição de fosfato mono hidratado de sódio também demonstrou remoção de cor do melaço (27,9%).

Comparando as Tabelas 1 e 2 observamos que houve variação de precipitação apenas durante a decantação a 30°C, ou seja, quando o pH foi reduzido com ácido sulfúrico até 4,5., e os valores de pH e de °Brix pouco variaram. Assim a decantação a 40°C reduz a degradação dos componentes do melaço em melanóides.

A Tabela 2 indica que o repouso a 4°C foi mais eficiente, pois levou a uma perda de material melanóide de 31,2%. Portanto a condição de escolha é adição de H₂SO₄ (pH 4,5) em descanso por 48 horas à 4°C em câmara fria.

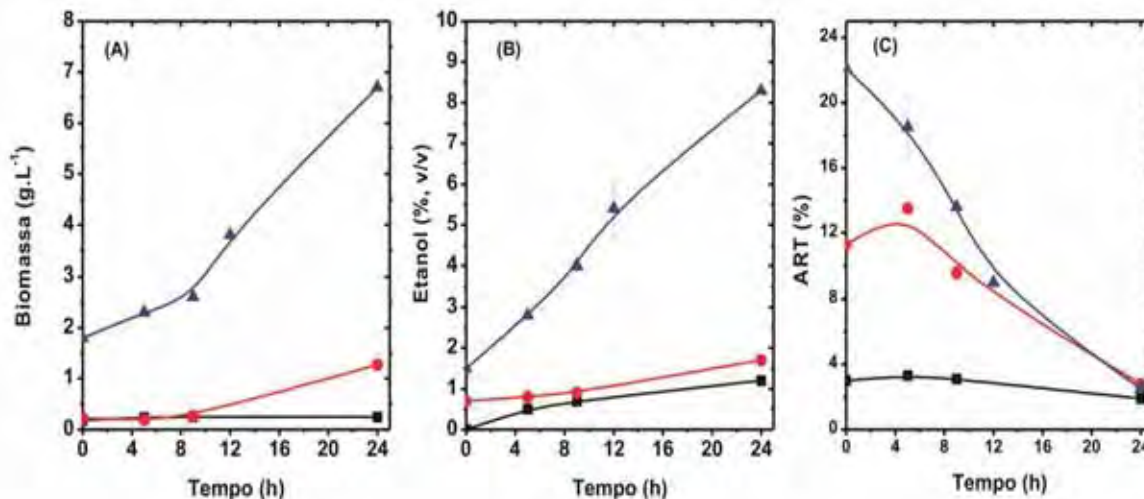
4.2 PROPAGAÇÃO EM MELAÇO NÃO SUPLEMENTADO

As propagações da levedura IQAr/45-2 foram realizadas em etapas de concentrações crescentes de açúcar no melaço. Propagações em melaço de concentrações crescentes são realizadas em destilarias em começo de safra (SCHMIDELL et al., 2001).

4.2.1 Efeito da concentração do açúcar no melaço não suplementado sobre as três etapas de propagação da levedura IQAr/45-2 a 30°C sem agitação (propagação I)

A Figura 19 mostra as curvas que correlacionam a biomassa, o etanol e o açúcar consumido pela levedura IQAr/45-2 em função do tempo de propagação a 30°C sem agitação.

Figura 19- Reproduzindo os dados da tabela 3 avaliamos o efeito do aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço (melaço 4% -■-, melaço 8% -●- e melaço 12% -▲-) em cada uma das três etapas de propagação da levedura IQAr/45-2 sobre as curvas de tempo de biomassa (A), etanol (B) e açúcares redutores totais – ART (C) em repouso (BOD) a 30°C. A viabilidade não variou, ficando em aproximadamente 99% ± 0,2 durante o crescimento.



Fonte: ³Elaborada pela autora.

Nas curvas descritas na “parte A” da Figura 19, observa-se ausência de crescimento em melaço 4% durante 24h de propagação. Além disto, um crescimento significativo só foi observado em melaço inicial 8% após 9h atingindo um valor de 1,2g.L⁻¹ após 24h a 30°C. O meio contendo células propagadas em melaço 8% foi vertido no meio concentrado 2x, atingindo um volume de 100mL com melaço 12%. Após 24h de propagação em melaço 12%, o rendimento de biomassa foi de 6,7g.L⁻¹ enquanto que o etanol produzido foi de 8.3% (“parte B”, Figura 19). O açúcar residual (“parte C”, Figura 19) caiu ao longo da propagação atingindo um valor mínimo em 24h, sendo que em melaço 8% um máximo de açúcar residual foi obtido em 4h. Parece que em melaço 8% ocorre uma adaptação a concentrações elevadas de melaço.

A Tabela 3 reúne as medidas finais obtidas com a levedura IQAr/45-2 relativas a viabilidade, biomassa, etanol e açúcar residual, já descritos na Figura 19.

³ Figuras de 19-37, elaboradas pela autora.

Tabela 3 – Efeito do aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço (4%, 8% e 12%) sobre os valores iniciais e finais das medidas descritas na Fig. 22, para viabilidade, biomassa, etanol, açúcares redutores totais (ART) nas três etapas da propagação da levedura IQAr/45-2 em cultivo estacionário (BOD) a 30°C.^(a)

Parâmetros da propagação	Concentração do melaço em cada etapa da propagação (%, ART)		
	4	8	12
Volume de meio _{total} (mL)	25	50	100
Tempo total da propagação (h)	24	24	24
Médias Biomassa			
Inicial (g.L ⁻¹)	0,18 ± 0,12	0,22 ± 0,10	1,8 ± 0,1
Final (g.L ⁻¹)	0,25 ± 0,10	1,27 ± 0,45	6,7 ± 0,1
Acúmulo _{Final – Inicial} (g.L ⁻¹)	0,06	1,05	4,91
Média Etanol _{final} (%, v/v)	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,1	8,3 ± 0,0
Média ART _{final} (%)	1,9 ± 0,0	2,8 ± 0,2	2,5 ± 0,3

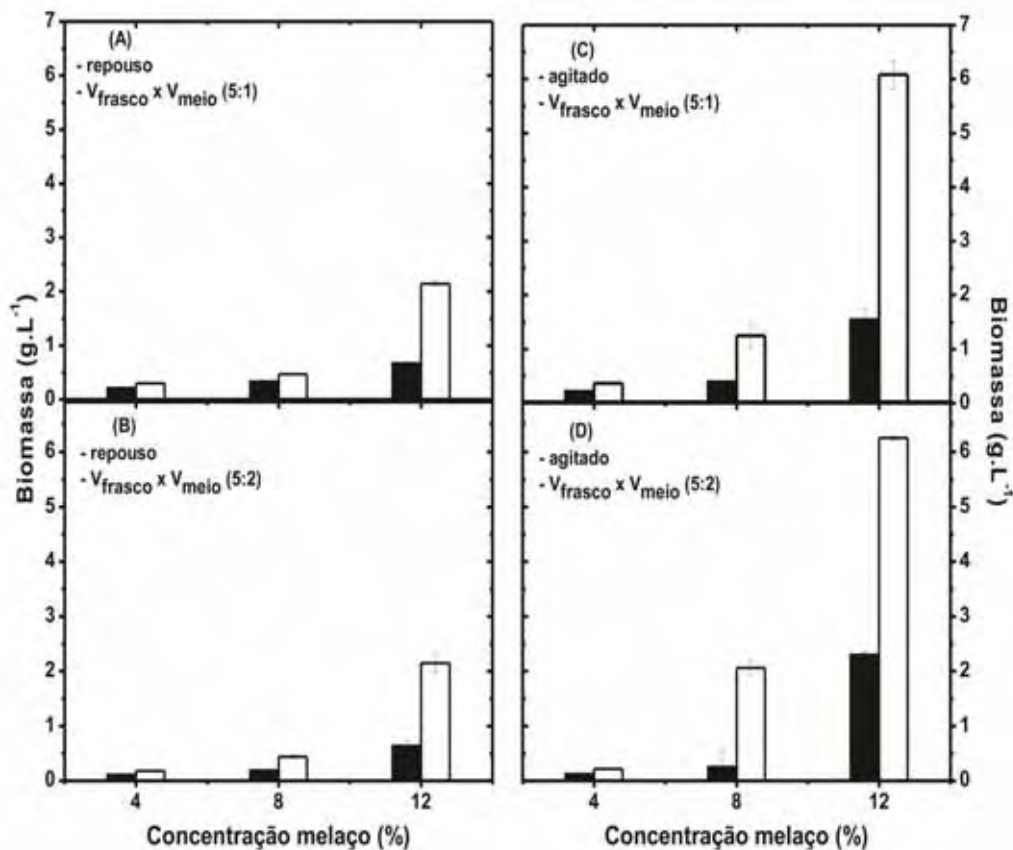
^(a) A viabilidade não caiu, mostrando valores ao redor de 99% durante as 3 etapas de propagação.

Como já descrito na Figura 19 a Tabela 3 mostra que o acúmulo de biomassa foi muito baixo em melaço 4% e 8%, ocorrendo uma elevação significativa só no final da propagação em melaço 12%. A redução do açúcar não foi significativa durante a propagação em melaço 8%. Portanto, com base nestes dados a condição selecionada deve envolver 24 horas de crescimento em cada etapa.

4.2.2 Efeito do aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço não suplementado, relação $\text{Vol}_{\text{frasco}}/\text{Vol}_{\text{meio}}$ e da agitação sobre a propagação em três etapas da levedura IQAr/45-2 a 30°C.

A Figura 20 demonstra acúmulo de biomassa produzido durante a propagação da levedura IQAr/45-2 com aumento progressivo da concentração do melaço, em relação a proporção $\text{Vol}_{\text{frasco}}/\text{Vol}_{\text{meio}}$ de 5:1 na parte A e C e proporção 5:2 na parte B e D. Observa-se acúmulo de biomassa em ambas as proporções de meio utilizadas. A maior biomassa obtida no final da propagação foi de 4,5g.L⁻¹ (0,45g/100mL) na proporção de 5:1 e 3,94g.L⁻¹ (0,78g/200mL) na proporção 5:2, ambos em cultivo agitado a 30°C.

Figura 20 - Reproduzindo os dados da tabela 4 avaliamos o efeito do aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço, da relação $\text{Vol}_{\text{frasco}}/\text{Vol}_{\text{meio}}$ (proporção 5:1 na parte “A” e “C”, proporção 5:2 na parte “B” e “D”) e da agitação (100 rpm em “shaker” ou sem agitação em BOD) sobre os valores iniciais (-■-) e finais (-□-) de biomassa durante as três etapas consecutivas de crescimento da levedura IQAr/45-2 à 30°C. A viabilidade não variou, ficando em aproximadamente $98,6\% \pm 1,47$.



A Tabela 4 mostra os valores descritos na Figura 20 para medidas biomassa durante a propagação da levedura IQAr/45-2 com o aumento progressivo da concentração do melaço, em relação $\text{Vol}_{\text{frasco}}/\text{Vol}_{\text{meio}}$ a 30°C variando-se a condição de incubação (BOD ou “Shaker”).

Tabela 4 – Efeito do aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço, da relação Vol_{frasco}/Vol_{meio} (proporção 5:1 na parte “A” e “B”, proporção 5:2 na parte “C” e “D”) e da agitação (“shaker” ou sem agitação) sobre os valores iniciais e finais de biomassa descritos na Fig. 20 durante as três etapas consecutivas de crescimento da levedura IQAr/45-2 à 30°C.^(a)

Condições de Propagação				Biomassa (g.L ⁻¹)		
Etapas da propagação	ART (%)	V _{frasco} /V _{meio} (mL)	Agitação	Média Inicial	Média Final	Final acumulada (Final-Inicial)
1º	4	125:25 ^b (5:1)	BOD (sem agitação)	0,21 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,09
			“Shaker” (100rpm)	0,21 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,16
		125:50 ^c (5:2)	BOD (sem agitação)	0,11 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,07
			“Shaker” (100rpm)	0,12 ± 0,01	0,22 ± 0,00	0,10
2º	8 ^d	250:50 ^b (5:1)	BOD (sem agitação)	0,33 ± 0,03	0,47 ± 0,01	0,14
			“Shaker” (100rpm)	0,39 ± 0,02	1,25 ± 0,22	0,87
		250:100 ^c (5:2)	BOD (sem agitação)	0,19 ± 0,01	0,44 ± 0,03	0,25
			“Shaker” (100rpm)	0,25 ± 0,03	2,06 ± 0,13	1,81
3º	12 ^d	500:100 ^b (5:1)	BOD (sem agitação)	0,67 ± 0,03	2,14 ± 0,05	1,47
			“Shaker” (100rpm)	1,54 ± 0,22	6,08 ± 0,26	4,54
		500:200 ^c (5:2)	BOD (sem agitação)	0,64 ± 0,01	2,15 ± 0,18	1,51
			“Shaker” (100rpm)	2,30 ± 0,05	6,24 ± 0,04	3,94

^(a) A viabilidade não caiu, mostrando valores ao redor de 98,6% ± 1,47 durante as 3 etapas de propagação agitadas ou não.

^(b) Quantidades crescente de melaço em um volume final de até 100 mL na proporção 5:1 (Vol Frasco: Vol meio)

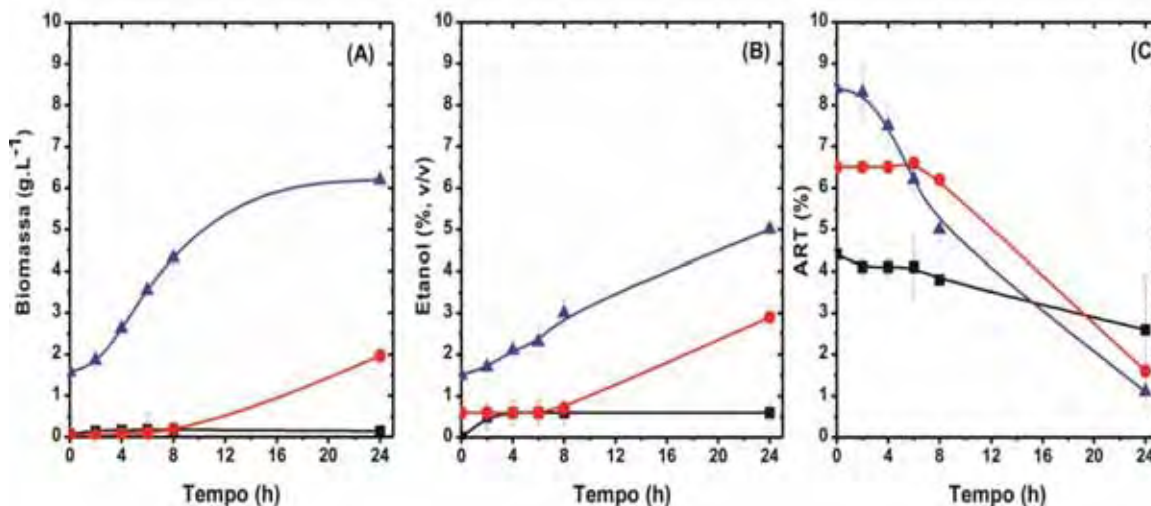
^(c) Quantidades crescente de melaço em um volume final meio propagado de 200 mL na proporção 5:2 (Vol Frasco: Vol meio)

As melhor condição de propagação constitui-se no uso de cultivo agitado, principalmente na proporção (Vol_{Frasco}: Vol_{meio}) de 5:2 a 30°C.

4.2.3 – Efeito do aumento progressivo da concentração do açúcar no melaço não suplementado sobre as três etapas de propagação da levedura IQAr/45-2 em baixa agitação (100rpm) a 30°C (propagação II).

A Figura 21 mostra a curva que correlaciona o acúmulo de biomassa em função do etanol produzido e do açúcar consumido pela levedura IQAr/45-2 durante a propagação agitada (100 rpm) a 30°C.

Figura 21 - Reproduzindo os dados da tabela 5 avaliamos o efeito do aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço, (melaço 4% -■-, melaço 8% -●- e melaço 12% -▲-) sobre as medidas de biomassa (A), etanol (B) e açúcares redutores totais – ART (C) nas três etapas da propagação da levedura IQAr/45-2 incubadas a 30°C sob baixa agitação. A viabilidade não variou, ficando em aproximadamente 99 % ± 1,5 ao longo das três etapas de propagação.



Nas curvas descritas na Figura 21 (parte A), observa-se um maior acúmulo de biomassa quando o melaço 12% (4,6g.L⁻¹) foi utilizado e, mais especificamente, após 12 horas de propagação. O rendimento da biomassa final em melaço 8% após 24 horas foi bem menor (1,8g.L⁻¹), sendo que o crescimento só foi iniciado neste melaço após 8 horas de propagação. As curvas de produção de etanol durante as etapas de propagação apresentaram perfis semelhantes aos descritos para o acúmulo de biomassa (Figura 21, parte B). Quanto ao consumo de açúcar (Figura 21, parte C) podemos observar que na segunda etapa de propagação em melaço 8%, a levedura IQAr/45-2 não consumiu até 8 horas de incubação o açúcar, passando a assimilar pouco açúcar acima deste período.

A Tabela 5 mostra as medidas de viabilidade, biomassa, etanol e açúcar residual (ART) obtidas durante a propagação da levedura IQAr/45-2 com aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço em baixa agitação (100 rpm) a 30°C.

Tabela 5 – Efeito do aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço sobre as medidas finais de viabilidade, etanol, açúcares redutores totais (ART) descritas na Fig. 21 e biomassa (inicial e final), nas três etapas da propagação da levedura IQAr/45-2 com pouca aeração (agitação de 100 rpm) a 30°C.^a

Parâmetros da propagação	Concentração do melaço em cada etapa da propagação (%, ART)		
	4	8	12
Volume final de meio (mL)	50	100	200
Tempo de incubação (h)	24	24	24
Médias Biomassas			
Inicial (g.L ⁻¹)	0,07 ± 0,03	0,10 ± 0,00	1,57 ± 0,15
Final (g.L ⁻¹)	0,14 ± 0,05	1,96 ± 0,21	6,19 ± 0,09
Acúmulo _{Final – Inicial} (g.L ⁻¹)	0,07	1,86	4,62
Média Etanol _{final} (%, v/v)	0,6 ± 0,1	2,9 ± 0,3	5,0 ± 0,1
Média ART _{final} (%)	2,6 ± 1,3	1,6 ± 0,9	1,1 ± 0,1

^a viabilidade não variou, ficando em aproximadamente 99 % ± 1,5.

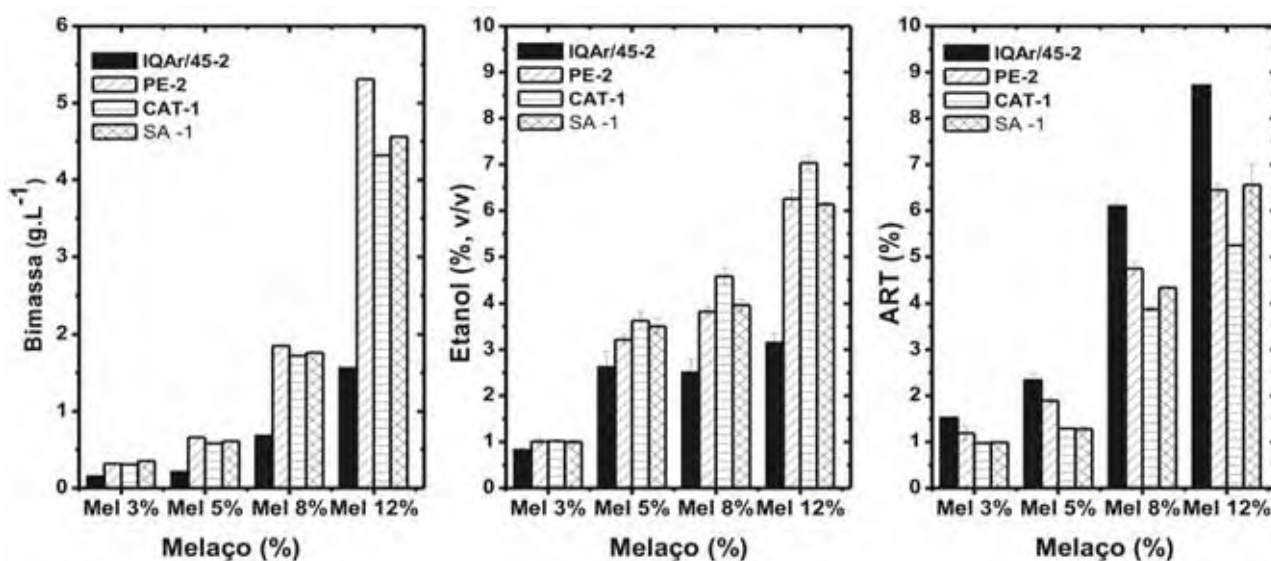
A Tabela 5 confirma os dados mostrados na curva da Figura 21 quanto aos efeitos do aumento progressivo da concentração do melaço da levedura IQAr/45-2 sobre o acúmulo de biomassa.

Comparando-se a Figura 19 com a Figura 21, observamos que as condições de propagação da levedura IQAr/45-2 não variaram quanto aos parâmetros fermentativos, no entanto, observou-se que a condição agitada levou a um maior acúmulo de biomassa em 12 horas de incubação.

4.2.4 Efeito do aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço não suplementado durante as quatro etapas da propagação da levedura IQAr/45-2, comparando com as 3 leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) a 37°C sob agitação (propagação III).

A Figura 22 correlaciona o acúmulo de biomassa em função do etanol produzido e do açúcar consumido durante as 4 etapas de propagação (propagação III) em baixa agitação (100 rpm) a 37°C da levedura IQAr/45-2 comparando-a com as 3 linhagens industriais (PE-2, CAT-1 e SA -1). Os maiores rendimento de biomassa ocorreram com as três leveduras industriais.

Figura 22 - Reproduzindo os dados da tabela 6 avaliamos o efeito do aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço (melaço 3%, 5%, 8% e 12%) sobre as medidas de biomassa (A), etanol (B) e açúcares redutores totais – ART (C) em cada uma das quatro etapas da propagação da levedura IQAr/45-2 e das leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) em baixa agitação a 37°C.



A Tabela 6 demonstra o efeito do aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço sobre as medidas finais de viabilidade, etanol, açúcares redutores totais (ART) e biomassa, nas quatro etapas da propagação (propagação III) da levedura IQAr/45-2 e das três leveduras industriais PE-2, CAT-1 e SA-1 em baixa agitação (100 rpm) a 37°C mostrando que a levedura IQAr/45-2 apresenta um crescimento limitado. A Tabela 6 mostra que o crescimento é muito pequeno nas duas primeiras etapas da propagação para as 4 leveduras e, assim, talvez pudessem ser suprimidas do processo.

A Figura 22 e Tabela 6 comparam a levedura IQAr/45-2 com as três leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) durante a propagação a 37°C. As leveduras industriais apresentaram um acúmulo médio de biomassa da ordem de 5,9g.L⁻¹ no final da propagação, enquanto a levedura híbrida IQAr/45-2 demonstrou um rendimento de biomassa da ordem de 2,5g.L⁻¹, o que sugere que esta levedura apresenta alguma deficiência nutricional (dados não publicados) para este crescimento a 37°C.

Tabela 6 – Efeito do aumento progressivo da concentração de açúcar no melaço sobre as medidas finais descritas na Fig. 22 para viabilidade, etanol, açúcares redutores totais (ART) e biomassa (inicial e final), nas quatro etapas da propagação da levedura IQAr/45-2 e das três leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) em baixa agitação a 37°C.^a

Etapas de propagação	Leveduras			
	IQAr/45-2	PE-2	CAT-1	SA-1
1º Etapa (Melaço 3%)				
Volume _{total de meio} (mL)	50	50	50	50
Tempo incubação (horas)	12	12	12	12
Média das Biomassas				
Inicial (g.L ⁻¹)	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Final (g.L ⁻¹)	0,23 ± 0,00	0,40 ± 0,01	0,39 ± 0,00	0,44 ± 0,02
Acúmulo _{Final-inicial} (g.L ⁻¹)	0,15	0,21	0,31	0,35
Média Etanol _{final} (% v/v)	0,82 ± 0,05	1,01 ± 0,06	1,02 ± 0,03	1,00 ± 0,04
Média ART _{final} (%)	1,52 ± 0,00	1,19 ± 0,15	0,98 ± 0,02	0,99 ± 0,00
2º Etapa (Melaço 5%)				
Volume _{total de meio} (mL)	100	100	100	100
Tempo incubação (horas)	12	12	12	12
Média das Biomassas				
Inicial (g.L ⁻¹)	0,28 ± 0,00	0,33 ± 0,01	0,85 ± 0,03	0,50 ± 0,00
Final (g.L ⁻¹)	0,49 ± 0,05	0,99 ± 0,01	0,96 ± 0,01	1,11 ± 0,00
Acúmulo _{Final-inicial} (g.L ⁻¹)	0,21	0,66	0,58	0,61
Média Etanol _{final} (% v/v)	2,62 ± 0,35	3,22 ± 0,10	3,63 ± 0,19	3,51 ± 0,17
Média ART _{final} (%)	2,34 ± 0,14	1,89 ± 0,06	1,29 ± 0,01	1,28 ± 0,06
3º Etapa (Melaço 8%)				
Volume _{total de meio} (mL)	200	200	200	200
Tempo incubação (horas)	12	12	12	12
Média das Biomassas				
Inicial (g.L ⁻¹)	0,52 ± 0,00	0,73 ± 0,03	0,70 ± 0,03	0,76 ± 0,01
Final (g.L ⁻¹)	1,20 ± 0,01	2,58 ± 0,35	2,42 ± 0,10	2,52 ± 0,18
Acúmulo _{Final-inicial} (g.L ⁻¹)	0,68	1,85	1,72	1,76
Média Etanol _{final} (% v/v)	2,51 ± 0,28	3,83 ± 0,09	4,57 ± 0,19	3,97 ± 0,12
Média ART _{final} (%)	6,09 ± 0,10	4,74 ± 0,15	3,88 ± 0,04	4,33 ± 0,02
4º Etapa (Melaço 12%)				
Volume _{total de meio} (mL)	400	400	400	400
Tempo incubação (horas)	12	12	12	12
Média das Biomassas				
Inicial (g.L ⁻¹)	1,07 ± 0,08	2,39 ± 0,02	2,21 ± 0,01	2,34 ± 0,05
Final (g.L ⁻¹)	2,57 ± 0,16	7,69 ± 0,12	6,52 ± 0,36	6,87 ± 0,08
Acúmulo _{Final-inicial} (g.L ⁻¹)	1,56	5,31	4,32	4,56
Média Etanol _{final} (% v/v)	3,15 ± 0,21	6,25 ± 0,19	7,03 ± 0,15	6,14 ± 0,04
Média ART _{final} (%)	8,71 ± 0,01	6,44 ± 0,12	5,24 ± 0,02	6,56 ± 0,46

^a A viabilidade não variou, ficando em aproximadamente 99%.

As fotos abaixo (Figura 23 a 26) revelam as características fenotípicas de cada linhagem utilizada na Figura 22 e Tabela 6, através do plaqueamento em meios diferenciados sólidos contendo corantes. As linhagens estoques das leveduras foram crescidas em meio YPD líquido a 30°C sob agitação (125 rpm) por 24hs e depois utilizadas na replicação.

Figura 23 – Plaqueamento da levedura IQAr/45-2 em meio Nagai (A) e meio WLN (B) após 5 dias de incubação à 30°C.

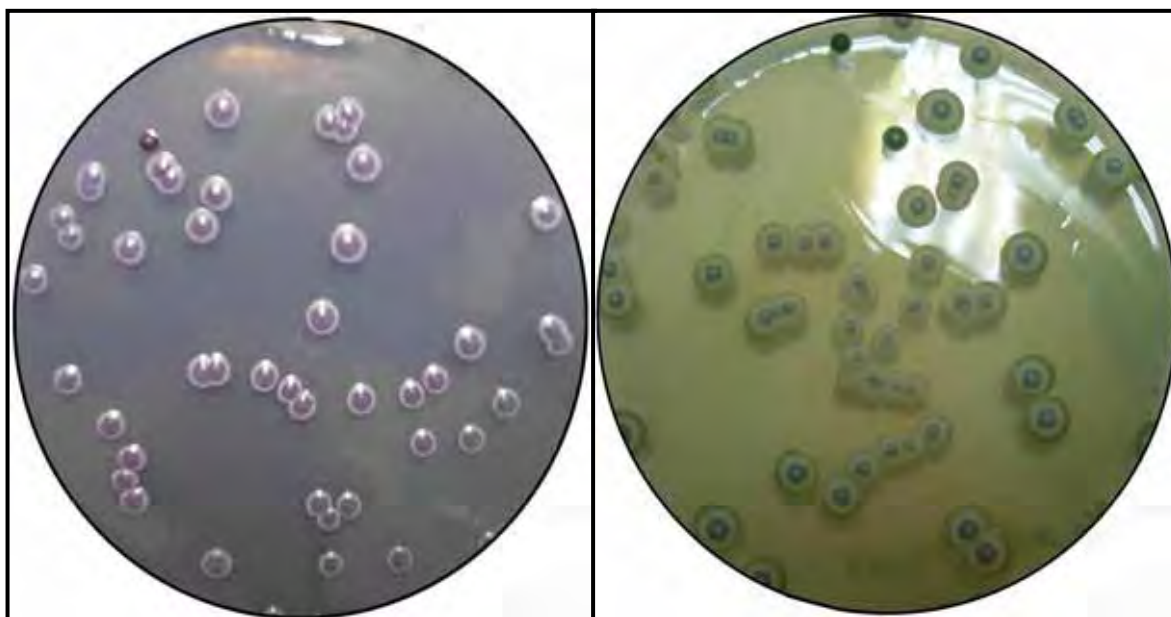


Figura 24 – Plaqueamento da levedura PE-2 em meio Nagai (A) e meio WLN (B) após 5 dias de incubação à 30°C.

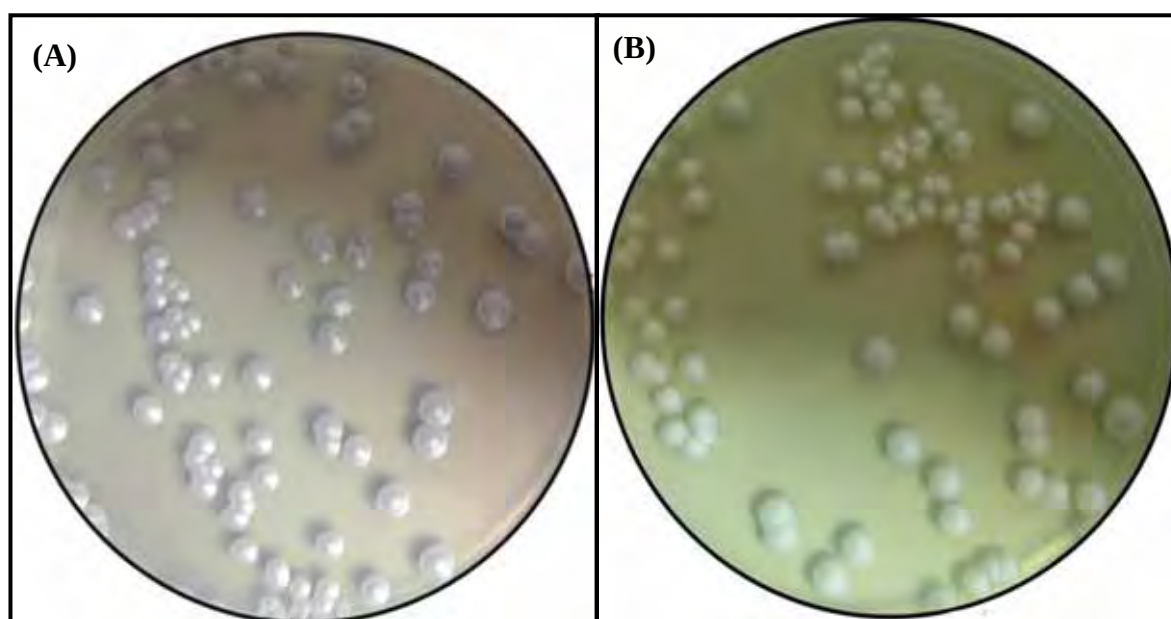


Figura 25 – Plaqueamento da levedura CAT-1 em meio Nagai (A) e meio WLN (B) após 5 dias de incubação à 30°C.

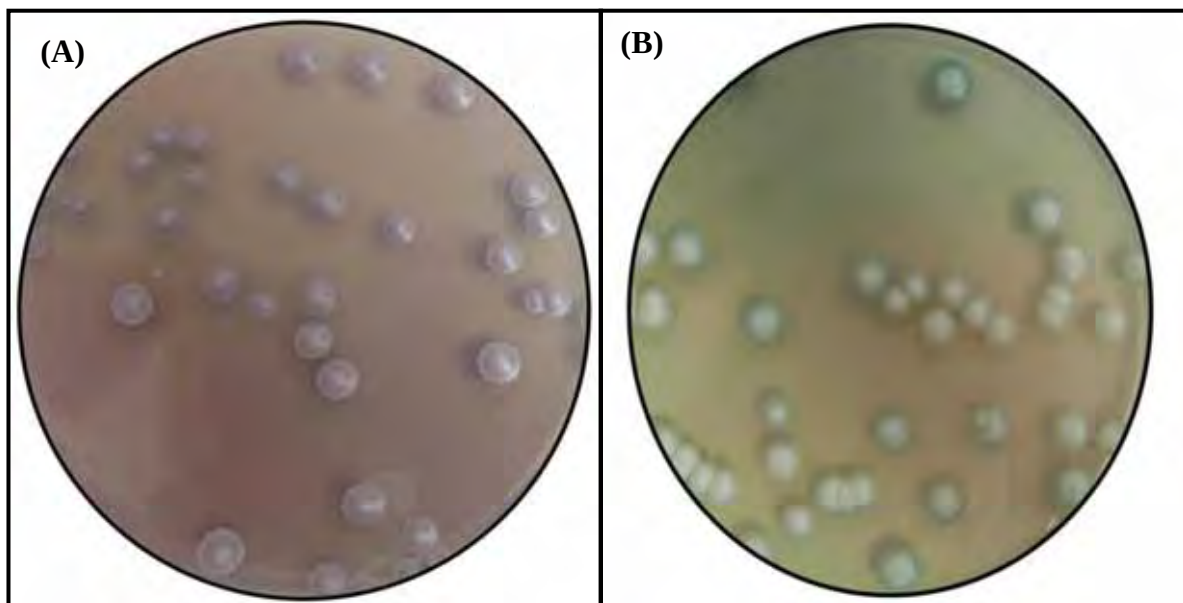
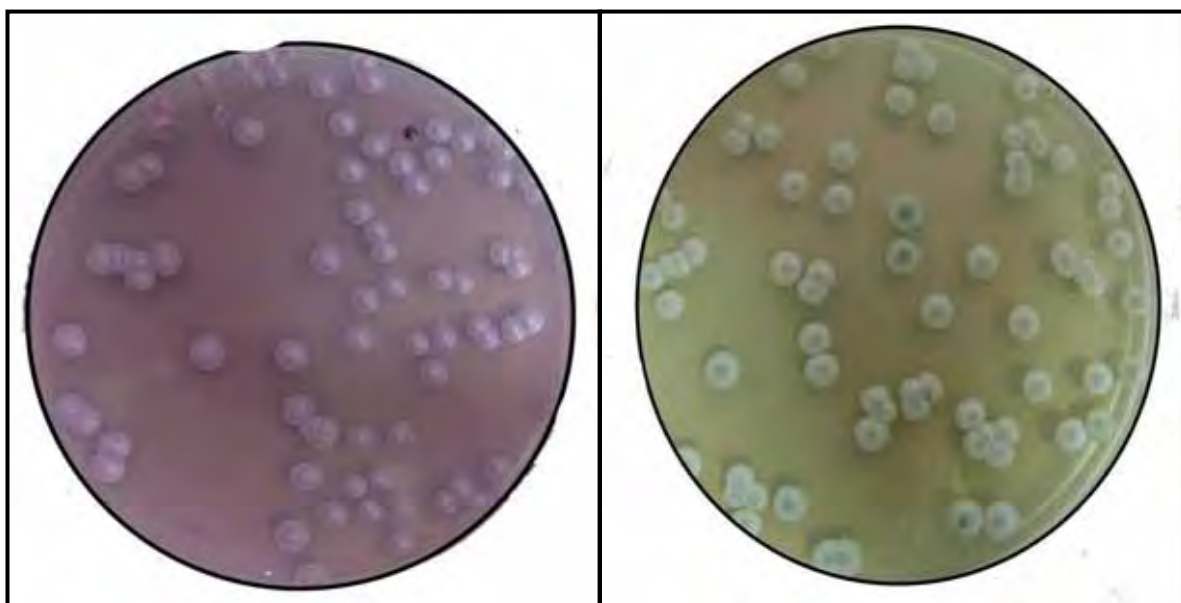


Figura 26 – Plaqueamento da levedura SA-1 em meio Nagai (A) e meio WLN (B) após 5 dias de incubação à 30°C.



Podemos observar por meio deste plaqueamentos (Figura 23 à 26) nos meios diferencias sólidos que as leveduras (levedura da coleção IQAr/45-2, e leveduras industriais PE-2, CAT-1 e SA-1) não apresentam instabilidade e nem deficiências respiratórios como indicado pelo meio Nagai (1963). Também ficou evidenciado que a levedura IQAr/45-2 apresenta uma coloração bastante específica em Meio Nagai e WLN, o que permite diferenciá-la das leveduras industriais.

4.2.5 Comparação entre as três formas de propagação utilizada para as leveduras.

A Tabela 7 compara o rendimento de biomassa obtido pela levedura IQAr/45-2 nos diferentes ensaios de propagação realizados.

Tabela 7 – Comparação dos três tipos de propagação em concentrações crescentes de açúcar no melaço não suplementado pela levedura IQAr/45-2.

Tipos de propagação		Condições do melaço			
		Vol total melaço (mL)	Tempo de incubação (h)	Rendimento Biomassa (g) ^a	(Final-Inicial) g.L ⁻¹
Propagação I (agitação a 30°C em três etapas)	(Fig. 19 e Tab. 3)	100	60	0,65	6,51
Propagação II (agitação a 30°C em três etapas)	(Fig. 21 e Tab. 5)	200	60	1,22	6,12
Propagação III (agitação a 37°C em quatro etapas)	(Fig. 22 e Tab. 6)	400	48	0,99	2,49

^a Acúmulo de biomassa (Final – Inicial) com base ao volume final de melaço no final da propagação.

A melhor condição de propagação é quando realizamos uma adaptação em três etapas (melaço 4%, 8% e 12%, propagação II) da levedura IQAr/45-2 com agitação a 30°C, pois obtivemos um acúmulo de biomassa da ordem de 6,12g.L⁻¹ à 30°C. A elevação da temperatura de 30°C para 37°C prejudicou um pouco a propagação da levedura IQAr/45-2, mas quando adotamos a temperatura de 37°C possibilitamos que as leveduras entre adaptadas ao reatores para conduzirmos fermentações em altas temperaturas.

A Tabela 8 compara o rendimento de biomassa obtido pela levedura IQAr/45-2 com as três leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) durante a propagação a 37°C em baixa agitação. Talvez uma solução fosse utilizar uma etapa com melaço 8% e uma segunda com melaço 12% a 34°C e evitar propagação a 37°C. Talvez o rendimento da biomassa destas leveduras industriais possa ser muito superior a 30°C.

Tabela 8 – Comparação dos rendimentos de biomassa no final da propagação entre a levedura IQAr/45-2 e as três leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) em melaço não suplementado sob baixa agitação a 37°C.

Leveduras	Acúmulo de biomassa ^a (Final-Inicial)		
	Vol total melaço (mL)	g/400 mL ^b	g.L ⁻¹
IQAr/45-2	400	0,99	2,49
PE-2	400	3,05	7,62
CAT-1	400	2,57	6,43
SA-1	400	2,71	6,78

^a Acúmulo de biomassa (Final – Inicial) com base ao volume final de melaço no final da propagação.

^b Acúmulo de biomassa com base no volume final de melaço (400 mL) propagado para cada levedura no final de 48 horas.

4.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR NO MELAÇO DE ESTOCAGEM DO LEITE DE LEVEDURA USADO ENTRE CICLOS SUCESSIVOS DE FERMENTAÇÃO.

Para obtenção do leite de levedura a ser reativado, dois ciclos de fermentação utilizando melaço contendo 20% de açúcar (ART) e 24g.L⁻¹ de células (em relação ao volume final do meio) foram realizados a 37°C e a seguir as células foram submetidas à reativação por incubação em melaço contendo diferentes concentrações de açúcar, no final dos quais mediu-se as variações em biomassa e viabilidade. As células coletadas foram submetidas a condições diferentes de incubação em intervalos de 15 a 44 horas entre um ciclo de fermentação e o seguinte, com o objetivo de recuperar perdas em biomassa e a viabilidade.

A Tabela 9 mostra medidas de viabilidade, biomassa, etanol e consumo de açúcar (ART) no início e no final de 12 horas de ativação (agitação de 100 rpm e 37°C) das suspensões de células. Durante este tempo de tratamento ocorreram em média aumentos em biomassa de até 10,3% a 38,7% dependendo das condições, com perdas em viabilidade.

Tabela 9 – Variações em viabilidade, biomassa e etanol das células do leite de levedura suspensas em melaço contendo 5% e 8% de açúcar na presença ou não de suplemento após 12 horas de incubação com agitação de 100 rpm a 37°C.

Concentração do melaço em cada etapa da revitalização (% ART)	pH do meio de revitalização		
	4,5	6,0	6,0 (meio suplementado) ^b
Melaço 5%			
Volume _{total} de meio (mL)	25	25	25
Tempo incubação (horas)	12	12	12
Viabilidade _{Final} (%)	78,3 ± 0,5	80,6 ± 0,6	76,0 ± 6,1
Média das Biomassas			
Inicial (g.L ⁻¹)	21,8 ± 2,4	18,8 ± 5,0	21,5 ± 2,4
Final (g.L ⁻¹)	24,1 ± 0,9	23,6 ± 0,4	24,1 ± 1,7
Acúmulo _{Final-inicial} (g.L ⁻¹)	2,0	4,8	2,6
Média Etanol _{final} (% v/v)	2,8	3,2	2,6
Média ART _{final} (%)	1,3	1,3	1,3
Melaço 8%			
Volume _{total} de meio (mL)	25	25	25
Tempo incubação (horas)	12	12	12
Viabilidade _{Final} (%)	78,8 ± 0,3	79,5 ± 1,4	81,7 ± 2,2
Média das Biomassas			
Inicial (g.L ⁻¹)	17,7 ± 2,6	18,2 ± 1,1	17,8 ± 3,5
Final (g.L ⁻¹)	24,0 ± 0,2	24,3 ± 1,5	24,6 ± 0,9
Acúmulo _{Final-inicial} (g.L ⁻¹)	6,3	6,1	6,9
Média Etanol _{final} (% v/v)	4,0	4,5	3,3
Média ART _{final} (%)	2,2	2,1	2,4

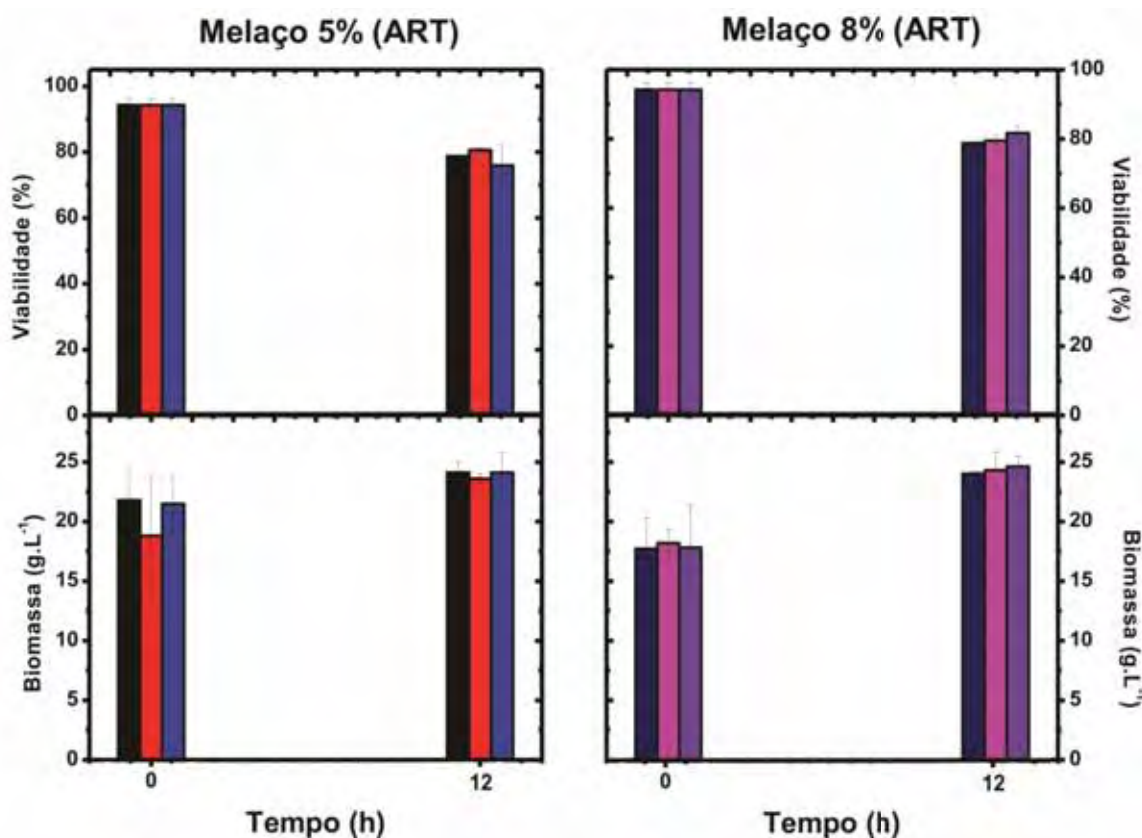
^a A viabilidade inicial variou em 94%.

^b Suplementos utilizados no meio de revitalização: 0,1% de DAP, 0,01 % de sulfato de magnésio heptahidratado e 0,01 % de sulfato de zinco heptahidratado

A melhor condição de ativação observada na Tabela 9 foi a condição na qual as células foram tratadas em melaço 8% de ART (aumento de 35,8% em biomassa). Além disto, observou-se que não existe a necessidade de suplementação do meio de revitalização, já que houve pouca diferença no acúmulo de biomassa quando tratadas em melaço 8% ART e também que o ajuste do pH não influenciou no acúmulo de biomassa, uma vez que as três condições testadas em melaço 8% ART, apresentaram valores muito próximos em relação a todos parâmetros analisados.

Com base na Figura 27, que confirma as informações listadas na Tabela 9, decidimos deixar o leite de levedura no meio de ativação selecionado (melaço 8% ART, pH 6,0), por 14-16 horas a 34°C, antes do início do ciclo de fermentação seguinte.

Fig. 27 – Reproduzindo os dados da tabela 9, avaliamos os resultados obtidos para medidas iniciais e finais de viabilidade (A), biomassa (B) durante a revitalização da levedura IQAr/45-2 à 37°C nos diferentes meios: (-■-) melaço 5% e pH 4,5; (-■-) melaço 5% e pH 6,0; (-■-) melaço 5% e pH 6,0 com adição de suplementos; (-■-) melaço 5% e pH 4,5; (-■-) melaço 5% e pH 6,0 e (-■-) melaço 5% e pH 6,0 com adição de suplementos. **Suplementos utilizados no meio de revitalização:** 0,1% de DAP, 0,01 % de sulfato de magnésio heptahidratado e 0,01 % de sulfato de zinco heptahidratado.

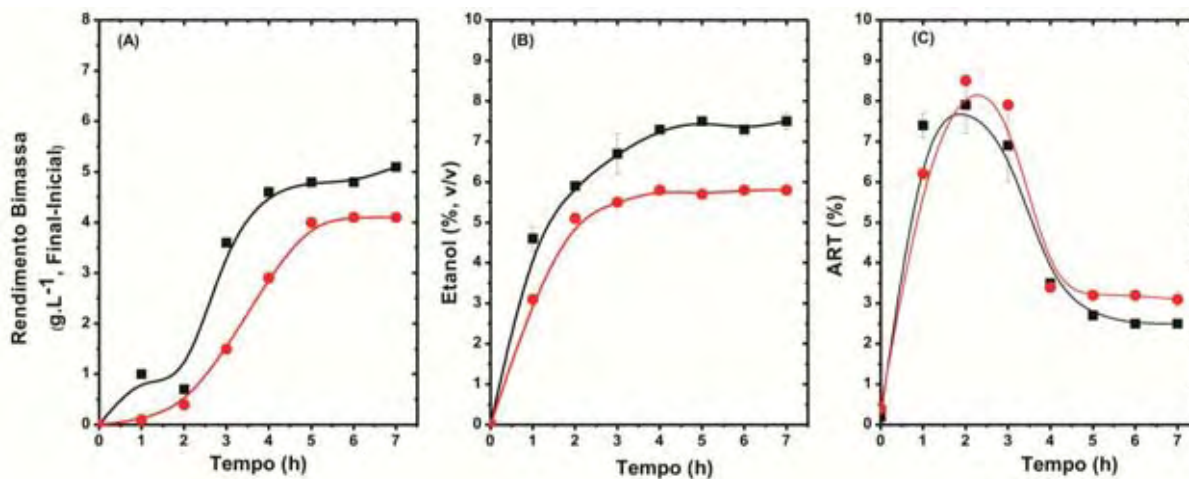


4.4 PADRONIZAÇÃO DAS FERMENTAÇÕES EM BATELADAS ÚNICAS ALIMENTADAS DA LEVEDURA IQAr/45-2 EM MELAÇO SUPLEMENTADO

4.4.1 Efeito do fluxo e tempo de alimentação do melaço 20% (ART) sobre a fermentação da levedura IQAr/45-2 a 37°C

O tempo de alimentação depende da vazão e deve ser realizada de tal forma que as demais condições da fermentação sejam mantidas constantes. Efeitos de uma alimentação de 3 horas (0,39mL/min.) sobre a produção de biomassa, etanol e consumo de açúcar foram comparados aos efeitos de uma alimentação de 5 horas (0,23mL/min.) em uma fermentação em batelada alimentada única da levedura IQAr/45-2 por 7 horas a 37°C como apresentado na Figura 28.

Figura 28 – Reproduzindo os dados da tabela 10 avaliamos o efeito da variação no tempo de alimentação do melaço (3h e 5h) nas fermentações em bateladas alimentadas únicas com a levedura IQAr/45-2 sobre as medidas de biomassa (A), etanol (B) e consumo de açúcar redutor total – ART (C) em melaço 20% (ART): (■) = tempo de alimentação de 3h (0,39 mL/min); (●) = tempo de alimentação de 5h (0,23 mL/min). **Condições da fermentação:** inoculo de 24 g.L⁻¹ (9%, v/v) e temperatura 37°C.



A Tabela 10 mostra o efeito do tempo de alimentação do melaço sobre a viabilidade, biomassa, etanol e consumo do açúcar durante uma fermentação em batelada alimentada única da levedura IQAr/45-2 por 7 horas a 37°C (descritos na Fig. 28).

Tabela 10 – Efeito da variação no tempo de alimentação do melaço nas fermentações em bateladas alimentadas únicas sobre as médias de viabilidade, etanol, açúcares redutores totais (ART) e biomassa (inicial e final), durante 7 horas fermentação em sistema alimentado com melaço suplementado 20% ART (dados obtidos na Fig. 28).¹

Medidas da Fermentação	Tempo de alimentação (h)	
	3 (0,39mL/min)	5 (0,23mL/min)
Tempo de fermentação (h)	7	7
Viabilidade		
Inicial (%)	100 ± 0,0	99,6 ± 0,6
Final (%)	95,9 ± 0,9 ^a	96,1 ± 0,1 ^b
p (Teste χ^2)	-	0,945
Biomassa		
Inicial (g.L ⁻¹)	22,2 ± 0,1	21,9 ± 0,7 ^b
Final (g.L ⁻¹)	27,3 ± 0,1 ^a	26,0 ± 0,3 ^b
p (Teste t)	-	0,100
Acúmulo Final – Inicial (g.L ⁻¹)	5,1 ± 0,0	4,1 ± 0,8
μ_{Xmax} (g.g.h ⁻¹)	0,80	1,25
$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Etanol Final (% v/v)	7,5 ± 0,2 ^a	5,8 ± 0,0 ^c
p (Teste t)	-	0,006
μ_{Pmax} (g.g.h ⁻¹)	0,99	0,92
$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	0,34 ± 0,00	0,27 ± 0,00
Produtividade (g.L ⁻¹ h ⁻¹)	8,4	6,5
Rendimento (%)	57,5	44,6
ART Final (%)	2,5 ± 0,1 ^a	3,1 ± 0,2 ^b
p (Teste t)	-	0,070

¹**Condições da fermentação:** Propagação II (baixa agitação à 30°C). Fermentação utilizando melaço 20% (ART) suplementado com fluxo de 0,39 mL/min. (3h) e inóculo de 24 g.L⁻¹ (9%, v/v).

Ensaio realizado com Teste χ^2 ($\alpha = 0,05$) para medidas de viabilidade: “a” médias do experimento controle usado na comparação; “b” médias estatisticamente equivalentes; “c” médias estatisticamente diferentes.

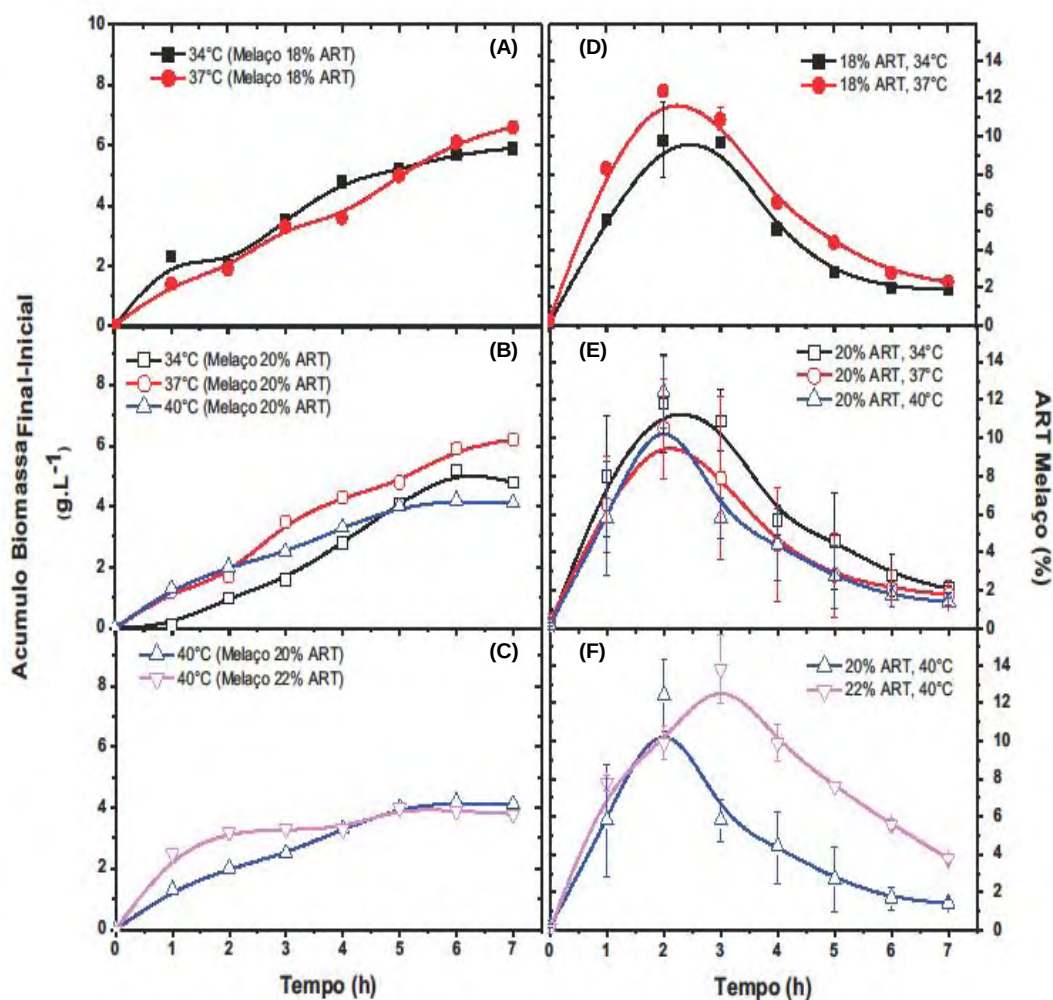
Ensaio realizado com Teste t ($\alpha = 0,05$): “a” médias do experimento controle usado na comparação; “b” médias estatisticamente equivalentes; “c” médias estatisticamente diferentes.

O tempo de alimentação de 3 horas (Tabela 10) implicou em uma vazão de 0,39 mL/min, enquanto que para a alimentação de 5 horas foi necessária uma vazão de 0,23 mL/min. para a adição do mesmo volume de melaço. Nas duas condições de alimentação houve um aumento de biomassa da ordem de 5,1g.L⁻¹ e 4,1g.L⁻¹ com um rendimento em etanol final de 7,5% (v/v) para a alimentação de 3 h e 5,8% (v/v) para a alimentação de 5h sem perdas de viabilidade. Após 6 horas de fermentação para ambas as condições (Figura 28) observamos acúmulo de biomassa, sendo o maior quando utilizamos o fluxo de alimentação 0,39mL/min. (3h), e um rendimento de etanol de 57,5%, em relação a alimentação de 5h (0,23mL/min) que mostrou um rendimento de etanol de 44,6%. Sendo assim, a condição de escolha foi alimentação de 3 horas (0,39mL/min.).

4.4.2 Efeito da concentração do açúcar no melaço suplementado (18% a 22% ART) sobre a fermentação com a levedura IQAr/45-2 com temperaturas variando de 34°C a 40°C.

A Figura 29 e Tabela 11 permitem comparar o desempenho da levedura IQAr/45-2 durante as fermentações quando se avalia os efeitos da temperatura (34°C, 37°C e 40°C) e da concentração do melaço (18%, 20% e 22% ART em função do volume final de meio no reator) sobre a produção de etanol, viabilidade, acúmulo de biomassa e consumo de açúcar (ART). O melaço foi adicionado por 3 horas (0,39 mL/min.) em todas as condições.

Fig. 29 – Reproduzindo os dados da tabela 11 avaliamos o efeito da variação da temperatura associada a variação da concentração do melaço sobre as curvas de biomassa (A, B e C) e açúcar residual total- ART (D, E e F) em ciclos únicos de fermentação em bateladas alimentadas únicas da levedura IQAr/45-2 com 7 horas de duração, sendo: fermentações utilizando melaço 18% ART a 34°C (-■-) e 37°C (-●-); fermentações utilizando melaço 20% ART 34°C (-□-), 37°C (-○-) e 40°C (-△-) e fermentações a 40°C com melaço 20% ART (-△-) e melaço 22% (-▽-).



A Figura 29 (parte A e B) demonstra as curvas de acúmulo de biomassa, evidenciando que a fermentação a 37°C tanto em melaço 18% como 20% em ART levou uma maior acúmulo de biomassa (na ordem de 6,3g.L⁻¹), enquanto as fermentações realizadas a 40°C (parte C) mostram menor acúmulo de biomassa (ordem de 3,9g.L⁻¹). Quanto ao consumo de açúcar (Fig. 29, Parte D a F) observamos diferentes porcentagens residuais com o aumento da temperatura. Pode-se observar que a diminuição da temperatura levou a um menor consumo de açúcar. No entanto, a elevação da temperatura para 40°C e da quantidade de açúcar (22% na alimentação) deixou o processo mais lento (Fig. 29 parte F). Assim, a levedura IQAr/45-2 sofre perdas na assimilação de açúcar a 40°C. A Figura 29 (Parte F) confirma o que já foi

observado na Tabela 11, ou seja, que altas concentrações de açúcar inibem o crescimento da levedura e a sua atividade fermentativa (LALUCE et al., 2009).

Tabela 11 – Efeito da variação de temperatura associada as variações em concentração de açúcar no melaço suplementado, em fermentações em bateladas alimentadas únicas da levedura IQAr/45-2 (dados fornecidos pela Fig. 29) sobre as medidas finais de viabilidade, biomassa, etanol e açúcares redutores totais (ART) durante 7 horas fermentação.¹

Medidas	Temperatura (°C)					
	34°C		37°C		40°C	
Concentração do Melaço (ART)	18%	20%	18%	20%	20%	22%
Tempo de fermentação (h)	7	7	7	7	7	7
Viabilidade						
Inicial (%)	99,6 ± 0,6	99,6 ± 0,0	99,3 ± 0,4	98,3 ± 0,4	98,8 ± 0,4	99,6 ± 0,2
Final (%)	97,1 ± 0,2 ^a	97,9 ± 0,5 ^b	95,6 ± 1,4 ^b	95,3 ± 0,9 ^b	90,3 ± 1,1 ^b	93,7 ± 0,3 ^b
p (Teste χ^2)	-	0,909	0,780	0,775	0,313	0,618
Biomassa						
Inicial (g.L ⁻¹)	20,3 ± 0,6	21,8 ± 0,8	20,7 ± 0,1	20,7 ± 0,2	21,1 ± 0,5	20,2 ± 0,3
Final (g.L ⁻¹)	26,2 ± 0,5 ^a	26,6 ± 0,4 ^b	27,3 ± 0,4 ^b	26,8 ± 0,7 ^b	25,2 ± 0,6 ^b	24,0 ± 0,5 ^c
p (Teste t)	-	0,545	0,136	0,416	0,210	0,045
Acúmulo _{Final - Inicial} (g.L ⁻¹)	5,9 ± 0,8	4,8 ± 0,9	6,6 ± 0,4	6,1 ± 0,7	4,1 ± 0,8	3,8 ± 0,6
μ_{Xmax} (g.g.h ⁻¹)	0,88	1,08	0,99	1,05	0,61	1,94
Y _{X/S} (g.g ⁻¹)	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Etanol Final (% v/v)	9,3 ± 0,3 ^a	9,9 ± 1,1 ^b	9,9 ± 0,3 ^b	9,4 ± 0,9 ^b	9,3 ± 1,1 ^b	10,6 ± 1,2 ^b
p (Teste t)	-	0,561	0,155	0,859	0,983	0,370
μ_{Pmax} (g.g.h ⁻¹)	0,65	0,58	0,41	0,92	1,48	1,23
Y _{P/S} (g.g ⁻¹)	0,40 ± 0,00	0,44 ± 0,01	0,44 ± 0,00	0,41 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,46 ± 0,01
Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	10,5	11,2	11,2	10,6	10,5	11,9
Rendimento (%)	71,6	76,6	76,6	72,8	71,8	81,6
ART Final (%)	1,9 ± 0,1 ^a	2,1 ± 0,2 ^b	2,3 ± 0,0 ^b	1,8 ± 0,7 ^b	1,4 ± 0,2 ^b	3,8 ± 0,2 ^c
p (Teste t)	-	0,879	0,477	0,879	0,178	0,040

¹Condições da fermentação: Propagação II (baixa agitação à 30°C). Fermentação em melaço suplementado com fluxo de 0,39 mL/min. durante 3h, e inóculo de 24 g.L⁻¹ (9%, v/v).

Ensaios realizados com Teste χ^2 ($\alpha = 0,05$) para medidas de viabilidade: “a” médias do experimento controle usado na comparação; “b” a médias estatisticamente equivalentes; “c” médias estatisticamente diferentes.

Ensaios realizados com Teste t ($\alpha = 0,05$): “a” médias do experimento controle usado na comparação; “b” a médias estatisticamente equivalentes; “c” médias estatisticamente diferentes.

A Tabela 11 demonstra os efeitos das diferentes concentrações de açúcar no melaço de alimentação com dados obtidos da Figura 29 sobre as variáveis do processo (viabilidade, biomassa, etanol e ART) em fermentações únicas e temperaturas na faixa de 34°C e 40°C. A viabilidade não variou significativamente nas fermentações únicas em temperaturas na faixa de 34°C e 40°C. Houve um acúmulo de biomassa em todas as condições, porém as melhores foram melaço 18% ART (acúmulo de 6,6 ± 0,4g.L⁻¹) e melaço 20% (6,1 ± 0,7g.L⁻¹) ambos a 37°C, sendo que a melhor velocidade de transformação de açúcar a etanol ($\mu_{Xmax} = 0,61$) foi observada na fermentação à 40°C utilizando melaço 20% ART. A produção de etanol pela levedura IQAr/45-2 não variou

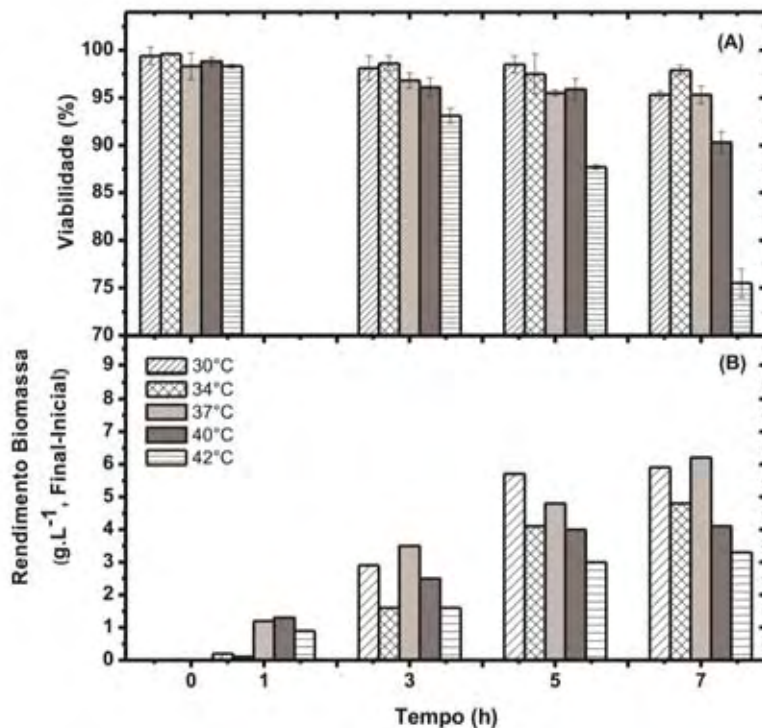
significativamente segundo a estatística em nenhuma condição da fermentação, tendo uma produção média de 9,3% a 10,6% (v/v), porém observamos diferentes velocidades de produção de etanol ($\mu_{p_{max}}$), sendo que nas temperaturas mais elevadas (40°C e 42°C) a velocidade foram as piores apresentadas. A condição que apresentou um maior rendimento de etanol (81,6%) foi melaço 22% (ART) a 42°C, mas isto se deve ao uso de maior concentração de açúcar no meio de fermentação, pois concomitantemente, foi a condição que apresentou maior tempo de conversão de substrato a produto e a biomassa, com um menor acúmulo de biomassa.

Com base nos dados da Figura 29 e Tabela 11 decidiu-se utilizar quantidades de açúcar no mosto de alimentação $\leq 22\%$ (ART) nos experimentos seguintes. O melhor desempenho fermentativo foi conseguido utilizando-se 20% de ART no melaço de alimentação à temperatura de 37°C.

4.4.3 Efeito das variações crescentes de temperatura nas fermentações em bateladas alimentadas com melaço suplementado 20% (ART) para levedura IQAr/45-2.

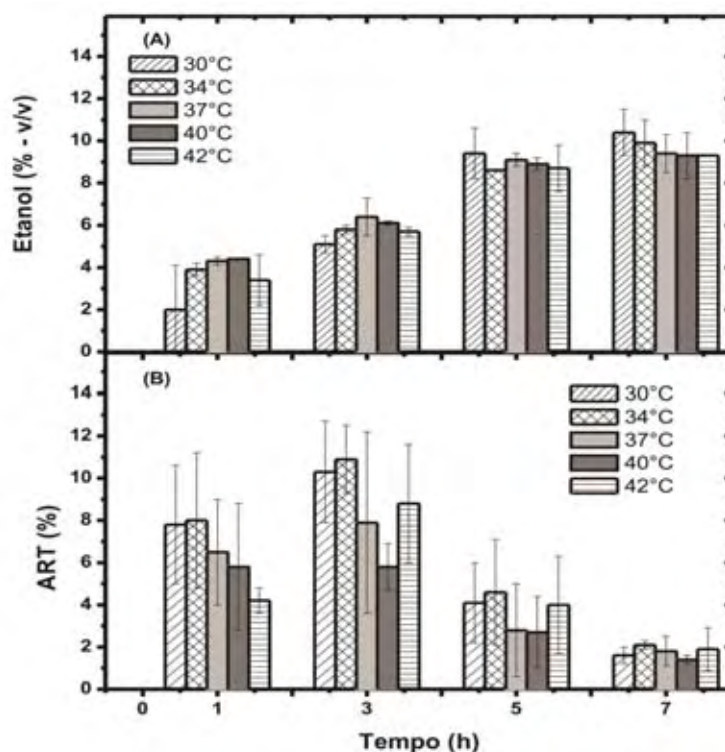
As Figura 30 e Figura 31 permitem comparar o desempenho da levedura IQAr/45-2 em fermentações de bateladas alimentadas únicas operando em uma ampla faixa de temperatura e alimentada com melaço de ART 20% (0,39mL/min.) e pH inicial de 4,5 quanto as medidas de viabilidade, biomassa, produção de etanol e consumo de açúcar residual, confirmando os dados descritos pela Tabela 12.

Figura 30 – Reproduzindo os dados da tabela 12 avaliamos o efeito da variação de temperatura (30°C a 42°C) em fermentações em bateladas alimentadas únicas com a levedura IQAr/45-2 sobre as medidas de viabilidade (A), biomassa (B), durante 7 horas fermentação. **Condições da propagação:** propagação II (100 rpm, à 30°C). **Condições da fermentação:** melaço 20% (ART) adicionada em 3 horas (0,39 mL/min.), inoculo de 24 g/L⁻¹ (9%, v/v) e pH 4,5.



A Figura 30 (parte A) mostra que não houve perdas significativas de viabilidade quando se fermentou entre 30°C-37°C, porém nas fermentações acima de 40°C ocorreram perdas em viabilidade após 6 horas (da ordem de 9%), enquanto que na fermentação a 42°C houve perdas de viabilidade a partir de 5 horas de fermentação e no final das 7 horas obteve-se uma viabilidade de 75,5%. A Figura 30 (parte B) mostra acúmulo maior de biomassa a 37°C confirmando os dados da Tabela 12.

Figura 31 – Reproduzindo os dados da tabela 12 avaliamos o efeito da variação de temperatura (faixa de 30°C a 42°C) em fermentações em bateladas alimentadas únicas com a levedura IQAr/45-2 sobre as medidas de etanol (A), açúcar residual – ART (B), durante 7 horas fermentação. **Condições da propagação:** propagação II (100 rpm, à 30°C). **Condições da fermentação:** melaço 20% (ART) adicionada em 3 horas (0,39 mL/min.), inoculo de 24 g/L⁻¹ (9%, v/v) e pH 4,5.



A parte A da Figura 31 confirma a ausência de variação na produção de etanol, enquanto que a parte B da mesma figura sugere que quanto maior a temperatura, mais rápido o consumo de açúcar. Um consumo mais lento e açúcar foram observados nas menores temperaturas, mas após 5 horas de fermentação o consumo quase se igualou. A melhor temperatura de fermentação parece ser de 37°C para a levedura IQAr/45-2, pois deixou pouco açúcar no meio, além de apresentar um maior acúmulo de biomassa.

Tabela 12 – Efeito da variação de temperatura (30°C à 42°C) nas fermentações em bateladas alimentadas únicas sobre as medias (obtidas nas Figuras 30-31) de viabilidade, biomassa, etanol e açúcares redutores totais (ART) da levedura IQAr/45-2 durante 7 horas fermentação em sistema alimentado com melaço de 20% (ART).¹

Medidas da Fermentação	Temperatura (°C)				
	30	34	37	40	42
Tempo de fermentação (h)	7	7	7	7	7
Viabilidade					
Inicial (%)	99,4 ± 0,9	99,6 ± 0,0	98,3 ± 1,4	98,8 ± 0,4	98,3 ± 0,2
Final (%)	95,3 ± 0,4 ^a	97,9 ± 0,5 ^b	95,3 ± 0,9 ^b	90,3 ± 1,1 ^b	75,5 ± 1,5 ^c
p (Teste χ^2)	-	0,706	0,958	0,451	0,001
Biomassa					
Inicial (g.L ⁻¹)	21,8 ± 1,2	21,8 ± 0,8	20,7 ± 0,2	21,1 ± 0,5	21,3 ± 0,4
Final (g.L ⁻¹)	27,7 ± 0,3	26,6 ± 0,4 ^b	26,8 ± 0,7 ^b	25,2 ± 0,6 ^b	24,7 ± 0,3 ^b
p (Teste t)	-	0,090	0,342	0,118	0,007
Acúmulo _{Final - Inicial} (g.L ⁻¹)	5,9 ± 1,2	4,8 ± 0,9	6,1 ± 0,7	4,1 ± 0,8	3,4 ± 0,5
μ_{Xmax} (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	1,34	1,08	1,05	0,62	0,60
Y _{X/S} (g.g ⁻¹)	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Etanol Final (% , v/v)	10,4 ± 1,1 ^a	9,9 ± 1,1 ^b	9,4 ± 0,9 ^b	9,3 ± 1,1 ^b	9,3 ± 0,0 ^b
p (Teste t)	-	0,712	0,445	0,432	0,293
μ_{Pmax} (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	0,82	0,40	0,36	0,39	0,66
Y _{P/S} (g.g ⁻¹)	0,45 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,41 ± 0,00
Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	11,7	11,2	10,6	10,5	10,5
Rendimento (%)	80,3	76,6	72,8	71,8	71,6
ART Final (%)	1,6 ± 0,4 ^a	2,1 ± 0,2 ^b	1,8 ± 0,7 ^b	1,4 ± 0,2 ^b	1,9 ± 1,0 ^b
p (Teste t)	-	0,358	0,766	0,498	0,733

¹**Condições da fermentação:** Propagação II (baixa agitação à 30°C). Fermentação em melaço suplementado com fluxo de 0,39 mL/min. durante 3h, e inóculo de 24 g/L⁻¹ (9%, v/v).

Ensaios realizados com Teste χ^2 ($\alpha = 0,05$) para medidas de viabilidade: “a” médias do experimento controle usado na comparação; “b” a médias estatisticamente equivalentes; “c” médias estatisticamente diferentes.

Ensaios realizados com Teste t ($\alpha = 0,05$): “a” médias do experimento controle usado na comparação; “b” a médias estatisticamente equivalentes; “c” médias estatisticamente diferentes.

A Tabela 12 mostra que: i) a viabilidade não variou no intervalo de temperatura entre 30°C a 40°C, exceto quando se fermentou a 42°C com uma perda significativa no final da fermentação (75,5%); ii) acúmulo máximo de biomassa a 37°C (relativa de 2,3%, v/v); iii) uma variação pouco significativa em etanol produzido na faixa de 37°C (9,3% , v/v) a 30°C (10,4%, v/v), com rendimentos e produtividade muito parecidos em todos os casos.

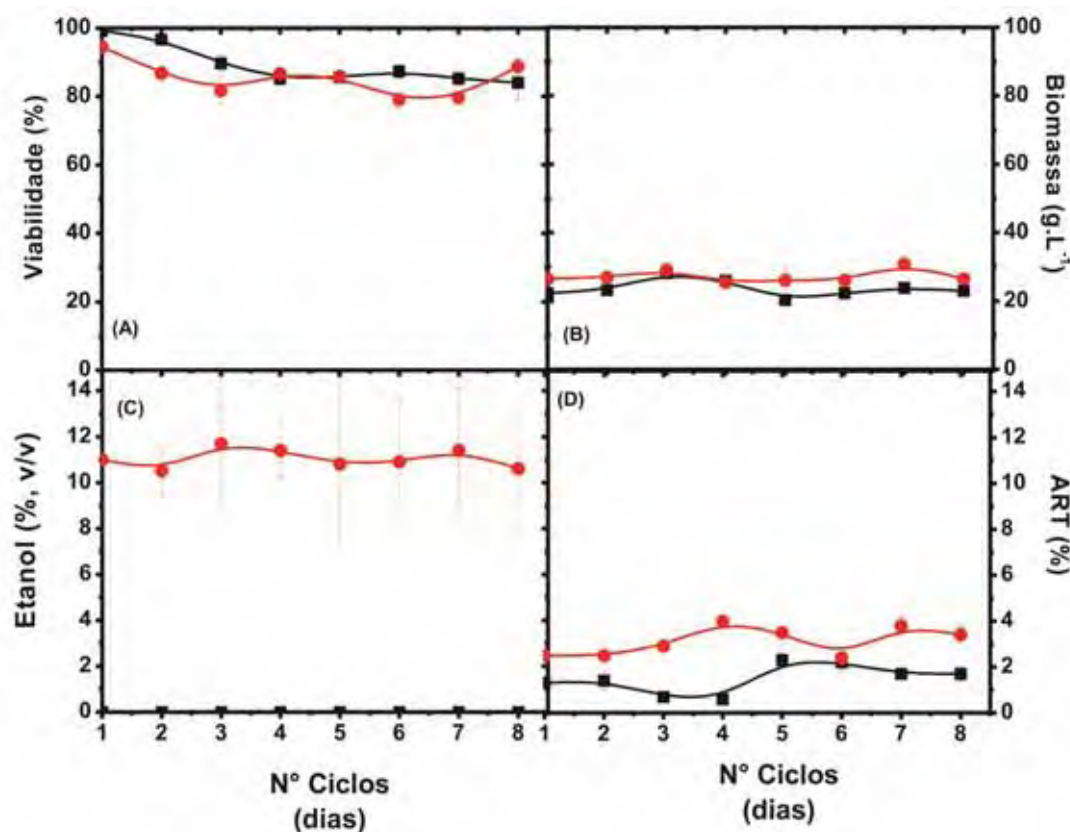
Com base nestes resultados, decidiu-se fermentar a levedura IQAr/45-2 à 37°C em melaço 20% (ART) suplementado e fluxo de alimentação de 0,39mL/min., inóculo de 24g.L⁻¹ (células iniciais de 9%, v/v) e pH 4,5 em fermentações sucessivas com reutilização de células.

4.4.4 Ciclos sucessivos de fermentação com a levedura IQAr/45-2 a 37°C utilizando melaço 20% de ART, intercalados por períodos de estocagem a 4°C entre um ciclo de fermentação e outro.

Ciclos sucessivos de fermentação foram realizados com a levedura IQAr/45-2 à 37°C em bateladas alimentadas contínuas com melaço 20% ART (0,39mL/min.) e pH 4,5. O inóculo utilizado foi de 24g.L⁻¹ (9%, v/v em função do volume final) e as células foram estocadas no próprio meio fermentado em geladeira a 4°C em intervalos de 16 horas entre um ciclos de fermentação e o seguinte.

A Figura 32 demonstra medidas iniciais e finais de biomassa, etanol e açúcar residual durante oito ciclos sucessivos de fermentação realizados com a linhagem IQAr/45-2 à 37°C em bateladas alimentadas contínuas com melaço 20% ART (0,39mL/min.) e pH 4,5.

Figura 32 – Reproduzindo os dados da tabela 13 avaliamos a variação nas medidas iniciais (-■-) e finais (-●-) para: viabilidade (parte “A”), biomassa (parte “B”), produção de etanol (parte “C”) e açúcar residual total - ART (parte “D”) durante oito ciclos sucessivos de fermentação à 37°C. **Condições da propagação:** propagação II (100 rpm, à 30°C). **Condições da fermentação:** melaço 20% (ART) adicionada em 3 hora (0,39 mL/min.), inóculo de 24 g/L⁻¹ (9%, v/v) tempo de fermentação 6hs. **Condições da fermentação:** estocagem das células entre os ciclos de fermentação à 4°C.



A Figura 32 mostra que o acúmulo médio de biomassa $3,7 \pm 1,2$ (g.L⁻¹) não variou durante os 8 ciclos sucessivos de fermentação, o mesmo acontecendo para produção de etanol que permaneceu na faixa de $11,0 \pm 0,4$ (% v/v). Quanto ao consumo de açúcar pode-se afirmar que não há variações significativas no final de cada ciclo de fermentação, deixando um residual médio de $3,2 \pm 0,6$ (%).

A Tabela 13 mostram os efeitos dos ciclos sucessivos de fermentação sobre a viabilidade, biomassa, etanol, açúcar residual em processo com reutilização de células em batelada alimentada contínua durante 8 ciclos sucessivos de fermentação à 37°C da levedura IQAr/45-2 utilizando dados da Figura 32.

Tabela 13 – Valores obtidos das médias iniciais e finais (descritos na Fig. 32) de viabilidade, biomassa, etanol e ART durante cada ciclo de fermentação à 37°C, utilizando melaço 20% de ART durante 6 horas de fermentação por 8 ciclos sucessivos.¹

Ciclos (Dias)	Medidas				
	Viabilidade ^a	Biomassa ^b		Etanol	ART
	Final (%)	Final (g.L ⁻¹)	Rendimento (g.L ⁻¹ , Final-Inicial)	Final (%, v/v)	Final (%)
1	94,6 ± 2,3	26,5 ± 1,0	4,3	11,0 ± 3,0	2,5 ± 0,5
2	86,8 ± 2,5	26,9 ± 0,9	3,6	10,5 ± 1,1	2,5 ± 0,4
3	81,7 ± 4,1	27,2 ± 0,5	3,4	11,7 ± 2,8	2,9 ± 0,2
4	86,7 ± 1,8	26,5 ± 0,6	3,4	11,4 ± 1,2	4,0 ± 0,0
5	85,8 ± 1,2	26,1 ± 0,4	4,5	10,8 ± 3,8	3,5 ± 0,2
6	79,2 ± 2,3	26,0 ± 1,2	3,8	10,9 ± 2,8	2,4 ± 0,3
7	79,7 ± 1,4	27,1 ± 0,3	3,3	11,4 ± 2,7	3,8 ± 0,4
8	88,8 ± 2,2	26,5 ± 1,3	3,6	10,6 ± 2,9	3,4 ± 0,4

¹Condições da fermentação: Propagação II (baixa agitação, 100 rpm à 30°C). Fermentação em melaço suplementado com fluxo de 0,39 mL/min. durante 3h, e inóculo de 24 g.L⁻¹ (9%, v/v).

Condições da estocagem: entre cada ciclo de fermentação e outro as células foram estocada à 4°C.

^a Viabilidade inicial média variando entre $89,4 \pm 5,5$;

^b Biomassa inicial média variando entre em torno de $22,9 \pm 0,8$ (g.L⁻¹);

De acordo com os dados obtidos na Tabela 13 pode-se dizer que houve poucas perdas em viabilidade no decorrer dos ciclos de 94,6% (final do 1º ciclo) para 88,8% (final do 8º ciclo). A Tabela 13 também descreve que o acúmulo de biomassa (ordem de $3,7 \pm 1,2$ (g.L⁻¹) não variou significativamente durante os 8 ciclos sucessivos de fermentação, o mesmo acontecendo para produção de etanol que permaneceu na faixa de $11,0 \pm 0,4$ (% v/v). Quanto ao consumo de açúcar pode-se dizer que este não variou significativamente no final de cada ciclo de fermentação (média de 3,2%). A estocagem das células no próprio meio no final da fermentação a 4°C parece não ter tido efeito

sobre o desempenho da levedura, o qual parece responder de forma adaptativa como indicado pelos aumentos de biomassa e etanol durante cada ciclo de fermentação.

Podemos concluir que a estocagem das células no próprio meio no final de fermentação a 4°C parece não ter tido efeito sobre o desempenho da levedura, como indicado por aumentos de biomassa e etanol observado na Tabela 13 e Figura 32.

4.5.5 Ciclos sucessivos de fermentação com a levedura IQAr/45-2 a 37°C utilizando melaço 20% de ART, intercalados por estocagem das células em melaço 8% de ART (sem suplementação), pH 6,0 a 30°C entre um ciclo e outro.

Ciclos sucessivos de fermentação foram realizados com a levedura IQAr/45-2 à 37°C em bateladas alimentadas contínuas com melaço 20% ART (0,39mL/min.) e pH 4,5. O inóculo utilizado foi de 24g.L⁻¹ (9%, v/v em função do volume final) e as células foram revitalizadas em melaço contendo 8% de açúcar (ART), pH 6,0 a 30°C nos intervalos de 16 horas entre um ciclo de fermentação e o seguinte.

A Tabela 14 mostra os efeitos dos ciclos sucessivos de fermentação sobre a viabilidade, biomassa, etanol, açúcar residual em processo com reutilização de células em batelada alimentada contínua durante 8 ciclos sucessivos de fermentação à 37°C da levedura IQAr/45-2 utilizando dados da Figura 33.

Tabela 14 – Valores obtidos das médias iniciais e finais (descritos na Fig. 33) de viabilidade, biomassa, etanol e ART durante cada ciclo de fermentação à 37°C, utilizando melaço 20% de ART durante 6 horas de fermentação por 8 ciclos sucessivos.¹

Ciclos (Dias)	Medidas				
	Viabilidade ^a	Biomassa ^b		Etanol	ART
	Final (%)	Final (g.L ⁻¹)	Rendimento (g.L ⁻¹ , Final-Inicial)	Final (%, v/v)	Final (%)
1	93,5 ± 1,8	30,3 ± 1,7	8,4	9,9 ± 3,5	3,0 ± 1,2
2	91,8 ± 0,8	35,6 ± 0,6	12,6	10,7 ± 3,8	2,1 ± 0,3
3	85,8 ± 0,6	33,0 ± 0,9	8,2	10,1 ± 1,9	3,4 ± 0,3
4	83,2 ± 1,8	29,9 ± 0,3	3,4	9,3 ± 5,4	5,3 ± 1,6
5	83,7 ± 1,4	34,1 ± 2,1	10,9	10,0 ± 0,9	3,8 ± 0,2
6	84,2 ± 0,5	29,3 ± 2,2	4,8	9,8 ± 1,4	5,0 ± 1,2
7	79,6 ± 2,1	31,8 ± 2,2	6,6	10,1 ± 3,6	4,7 ± 0,2
8	78,5 ± 0,6	30,3 ± 0,7	5,2	10,3 ± 0,2	4,7 ± 0,1

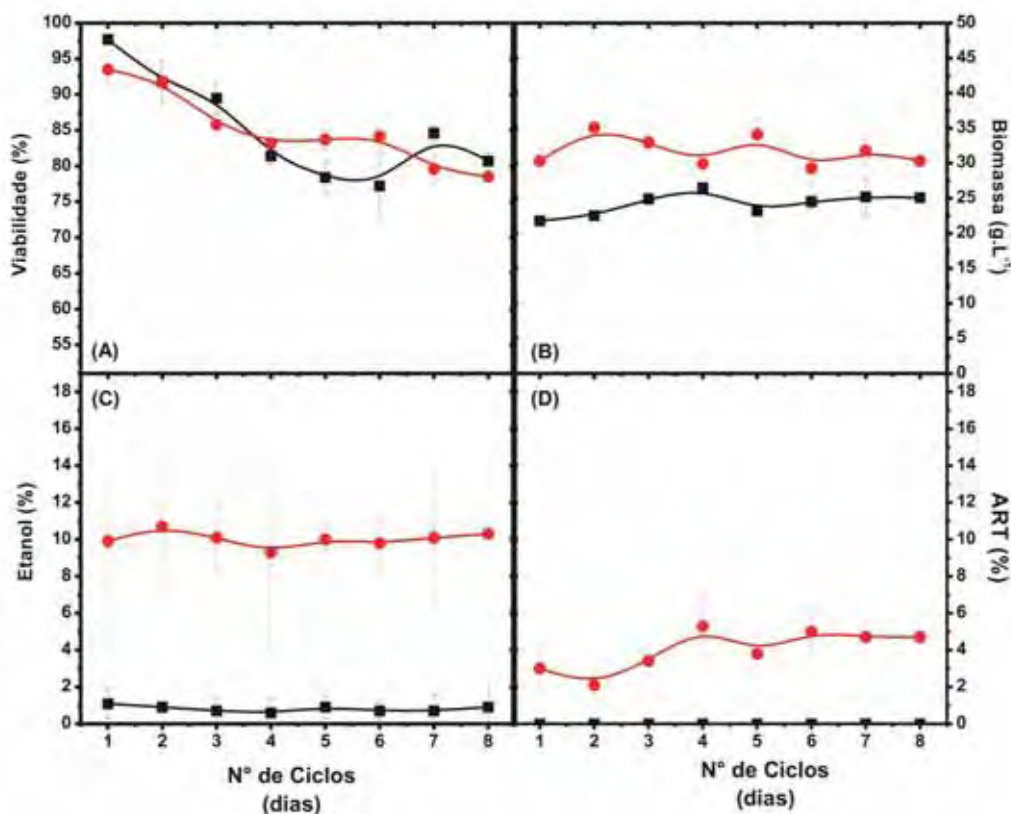
¹**Condições da fermentação:** Propagação II (baixa agitação, 80 rpm à 30°C). Fermentação em melaço suplementado com fluxo de 0,39 mL/min. durante 3h, e inóculo de 24 g.L⁻¹ (9%, v/v).

Condições da estocagem: entre cada ciclo de fermentação e outro as células foram estocada à 30°C em melaço 8% ART suplementado com sais.

A Tabela 14 demonstra medidas de viabilidade, biomassa, etanol e açúcar residual durante oito ciclos sucessivos de fermentação realizados com a linhagem IQAr/45-2 à 37°C em bateladas alimentadas contínuas com melaço 20% ART (0,39mL/min.) e pH 4,5. De acordo com os dados obtidos nesta tabela podemos afirmar que houve uma queda na viabilidade no decorrer dos ciclos de 93,5% (final do 1º ciclo) para 78,5% (final do 8º ciclo). Esta tabela também descreve que o acúmulo de biomassa (ordem de 7,5 ± 3,1 g.L⁻¹) variou durante os 8 ciclos sucessivos de fermentação, o mesmo não acontecendo para produção de etanol que permaneceu na faixa de 10,0 ± 0,4 (% v/v). Quanto ao consumo de açúcar pode-se dizer que este não variou significativamente no final de cada ciclo de fermentação (média de 4,0 ± 1,1 %).

A Figura 33 demonstra medidas finais de biomassa, etanol e açúcar residual durante oito ciclos sucessivos de fermentação realizados com a linhagem IQAr/45-2 à 37°C em bateladas alimentadas contínuas com melaço 20% ART (0,39mL/min.) e pH 4,5.

Figura 33 – Reproduzindo os dados da tabela 14 avaliamos as medidas dos parâmetros do processo: viabilidade (A), biomassa (B) etanol (C) e ART (D) durante a fermentação de 8 ciclos sucessivos à 37°C, utilizando ART de 20% no melaço de alimentação (fluxo de 0,39mL/min. durante 3h), inoculo de 24g.L⁻¹ (9%, v/v) com tempo de fermentação 6 horas, sendo: (■)= valores do início da fermentação; (●)= valores do final da fermentação. Condições da revitalização: estocagem das células entre os ciclos de fermentação em melaço 8% suplementado (1% de DAP, 0,1% ZnSO₄.7H₂O e 0,1% MgSO₄.7H₂O) incubado à 30°C e baixa agitação (100 rpm) por 16 horas.



A Figura 33 confirma os dados mostrados na Tabela 14, deixando evidente o acúmulo de biomassa (média de $7,5 \pm 3,1 \text{ g.L}^{-1}$) durante os 8 ciclos sucessivos de fermentação, o mesmo acontecendo para produção de etanol (ordem de $10,0 \pm 0,4 \%$, v/v) e consumo de açúcar no final de cada ciclo de fermentação.

Podemos concluir que a estocagem das células em melaço 8% de açúcar (ART), pH 6,0 a 30°C parece não ter sido tão eficiente para revitalização da viabilidade celular, ou seja, parece não ter tido efeito sobre a regeneração celular, como indicado por aumentos de biomassa na Tabela 14 e Figura 33.

4.5 COMPETIÇÃO ENTRE A LEVEDURA IQAr/45-2 E AS LEVEDURAS INDUSTRIAIS (PE-2, CAT-1 E SA-1) EM FERMENTAÇÕES INDIVIDUAIS E MISTAS A 40°C EM MELAÇO SUPLEMENTADO COM ART INICIAL DE 20%.

As culturas iniciadoras (“*starters*”) das fermentações são geralmente compostas de mais de uma linhagem de levedura, visando somar suas ações para obter o efeito desejado no produto final. Para se avaliar melhor a associação complexa do meio de fermentação, dois aspectos devem ser considerados: os resultados positivos das culturas mistas sobre o produto a ser fermentado e os resultados negativos e seus efeitos ou antagonismo (AMORIN et al., 2011).

Uma das alternativas mais simples para se estudar culturas iniciadoras de fermentação compreende inoculá-las em meio de fermentação (em melaço) e fazer as análises de parâmetros fermentativos, bem como, parâmetros fisiológicos gerados no processo e analisar se existe sinergismo entre essas linhagens de leveduras, ou então, se houve um efeito antagônico.

4.5.1 Competição entre a levedura IQAr/45-2 e as leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) em fermentações individuais a 40°C usando-se melaço suplementado com ART inicial de 20%.

A Figura 34 mostra as curvas de rendimento de biomassa, produção de etanol e consumo do açúcar em função do tempo de fermentação para cada levedura (IQAr/45-2, PE-2, CAT-1, SA-1) individualmente a 40°C. A análise dos dados obtidos durante a fermentação está descrita na Tabela 15.

Figura 34 – Reproduzindo os dados da tabela 15 avaliamos os gráficos de fermentação para comparar a levedura IQAr/45-2 com as leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) quanto a variação em rendimento de biomassa **(A)** etanol **(B)** e açúcar residual- ART **(C)** durante uma batelada única à 40°C, utilizando ART de 20% no melaço suplementado, inoculo de 24g.L⁻¹ (9%, v/v) com tempo de fermentação 7 horas.

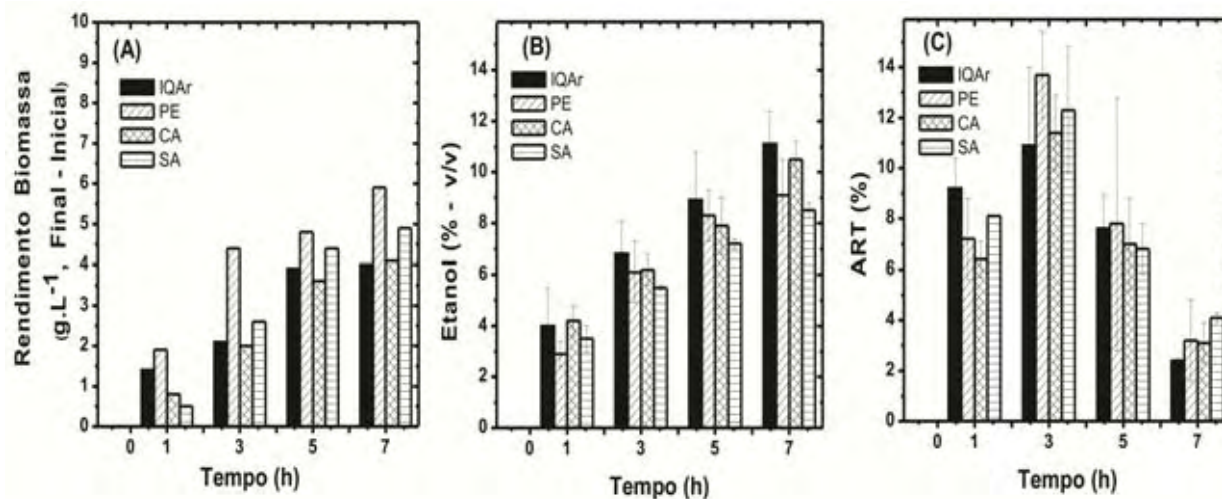


Tabela 15 – Comparação da levedura IQAr/45-2 com as leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) quanto aos valores iniciais e finais de viabilidade, biomassa, etanol e açúcar residual em bateladas únicas de fermentação à 40°C (dados da Fig. 34).¹

Variáveis da Fermentação	Leveduras			
	IQAr/45-2	PE-2	CAT-1	SA-1
Medidas da Fermentação				
Tempo de fermentação (h)	7	7	7	7
Viabilidade				
Inicial (%)	99,4 ± 0,7	99,9 ± 0,1	100 ± 0,0	100 ± 0,0
Final (%)	92,8 ± 0,5 ^a	95,3 ± 1,2 ^b	93,9 ± 1,3 ^b	94,7 ± 1,2 ^b
p (Teste χ^2)	-	0,705	0,859	0,769
Biomassa				
Inicial (g.L ⁻¹)	23,2 ± 1,2	24,1 ± 0,2	23,6 ± 0,6	24,2 ± 0,2
Final (g.L ⁻¹)	26,8 ± 0,2 ^a	30,1 ± 0,2 ^c	27,6 ± 0,8 ^b	29,8 ± 0,1 ^c
p (Teste t)	-	0,005	0,395	0,039
Acúmulo Final - Inicial (g.L ⁻¹)	3,9 ± 0,8	6,0 ± 0,3	4,0 ± 1,0	5,6 ± 0,2
μ_{Xmax} (g.g ⁻¹ h ⁻¹)	0,75	1,66	0,59	0,81
$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,00
Etanol Final (% v/v)	11,1 ± 1,3 ^a	9,1 ± 1,4 ^b	10,5 ± 0,7 ^b	8,5 ± 0,3 ^b
p (Teste t)	-	0,275	0,625	0,236
μ_{Pmax} (g.g ⁻¹ h ⁻¹)	0,55	0,62	0,48	0,60
$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	0,50 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,49 ± 0,00	0,42 ± 0,00
Produtividade (g.L ⁻¹ h ⁻¹)	12,5	10,2	11,8	9,6
Rendimento (%)	85,6	70,0	80,8	65,5
ART Final (%)	2,4 ± 0,1 ^a	3,2 ± 1,6 ^b	3,1 ± 0,8 ^b	4,1 ± 0,2 ^c
p (Teste t)	-	0,570	0,443	0,009
Parâmetros fisiológicos				
Proteína Total				
Inicial ($\mu\text{g}_{\text{proteína}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}^{-1}$)	0,30 ± 0,12	0,18 ± 0,13	0,22 ± 0,01	0,21 ± 0,01
Final ($\mu\text{g}_{\text{proteína}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}^{-1}$)	0,47 ± 0,28	0,20 ± 0,06 ^b	0,29 ± 0,06 ^b	0,22 ± 0,01 ^b
p (Teste t)	-	0,311	0,535	0,333
Glicerol Interno:				
Inicial ($\mu\text{g}_{\text{glicerol}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}^{-1}$)	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,08 ± 0,02
Final ($\mu\text{g}_{\text{glicerol}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}^{-1}$)	0,06 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,02 ^b	0,07 ± 0,00 ^b	0,06 ± 0,01 ^b
p (Teste t)	-	0,501	0,287	0,806
Trealose Interna				
Inicial ($\mu\text{g}_{\text{trealose}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}^{-1}$)	34,0 ± 3,4	33,8 ± 15,6	55,6 ± 26,7	64,8 ± 6,8
Final ($\mu\text{g}_{\text{trealose}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}^{-1}$)	71,0 ± 7,4 ^a	103,1 ± 25,8 ^b	87,7 ± 36,6 ^b	99,6 ± 21,5 ^b
p (Teste t)	-	0,340	0,640	0,325

¹Condições da fermentação: Propagação III (baixa agitação à 37°C). Fermentação em melaço suplementado com fluxo de 0,39mL/min. durante 3h, e inóculo de 24g.L⁻¹ (9%, v/v).

Ensaio realizado com Teste χ^2 ($\alpha = 0,05$) para medidas de viabilidade: “a” médias do experimento controle usado na comparação; “b” a médias estatisticamente equivalentes; “c” médias estatisticamente diferentes.

Ensaio realizado com Teste t ($\alpha = 0,05$): “a” médias do experimento controle usado na comparação; “b” a médias estatisticamente equivalentes; “c” médias estatisticamente diferentes.

Os dados mostrados até esta etapa do trabalho sugerem que as quatro leveduras apresentaram viabilidade constantes e elevadas (acima de 90%) durante toda a batelada (Tabela 15). A Figura 34 (parte A e B) e a Tabela 15 também indicam que a levedura IQAr/45-2 acumulou menor biomassa (Final-Inicial) e etanol final (11,1%, v/v) maior do que as leveduras industriais, isto porque, estes dois produtos (biomassa e etanol) são gerados em rotas metabólicas distintas, tal que se mais açúcar for desviado

para produção de etanol, menos biomassa será acumulada, dados confirmados na Tabela 15 pelos resultados obtidos para rendimento e produtividade de etanol pela levedura IQAr/45-2, respectivamente 12,5% e 85,6g.L⁻¹, seguidos pela levedura PE-2 que apresentou o segundo melhor resultado para rendimento e produtividade de etanol em relação as outras leveduras industriais.

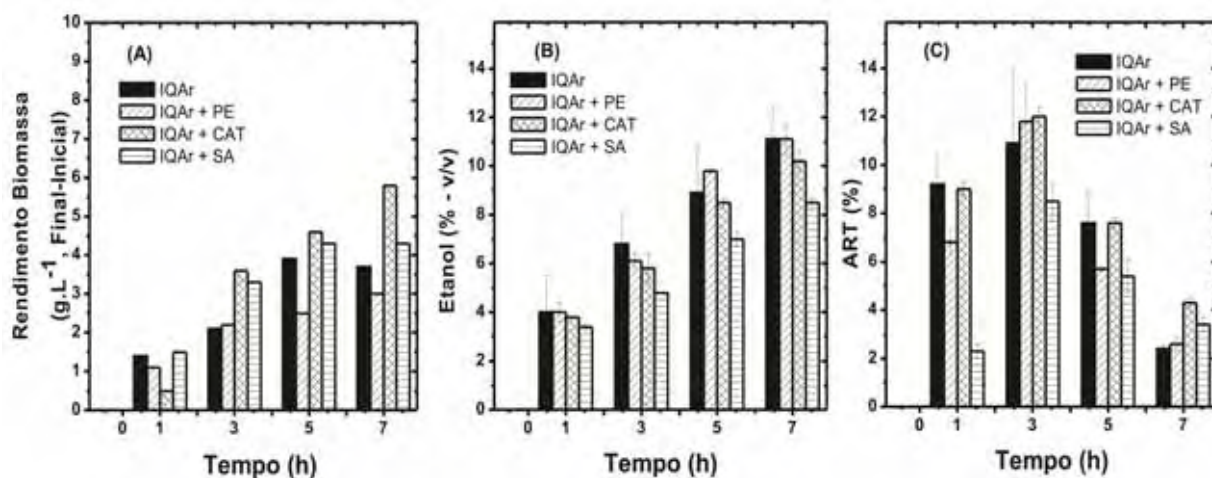
Pode-se observar que os teor de açúcar residual (Figura 34 parte C) foi menor para levedura IQAr/45-2 (2,4%) do que para três leveduras comerciais (ART médio de 3,5%).

Em relação aos parâmetros fisiológicos descritos na Tabela 15 pode-se concluir: i) teores de trealose no final da fermentação aumentaram para as 4 leveduras e, isto se deve, ao fato de que este carboidrato apresente capacidade de proteger as células durante estados de estresses; ii) quanto aos valores de glicerol, também se mantiveram elevados no final da fermentação para as quatro leveduras, isto talvez, porque esta fermentação se deu em uma temperatura muito alta (40°C), e o glicerol tem como principal papel ser osmorregulador interno das células. A formação externa e excessiva deste composto não é desejável, já que para sua produção a levedura utiliza açúcar do meio de fermentação para sintetizá-lo, deixando, assim, de formar mais etanol; iii) os valores de proteína total também aumentaram no final da fermentação para as quatro leveduras.

4.5.2 Competição entre a levedura IQAr/45-2 associada a uma levedura industrial (PE-2, CAT-1 E SA-1) em fermentações mistas a 40°C em melaço suplementado com ART inicial de 20%.

A Figura 35 mostra as curvas de rendimento em biomassa, produção de etanol e consumo do açúcar em função do tempo de fermentação da levedura IQAr/45-2 associada a uma das três leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) a 40°C. A análise dos dados obtidos durante a fermentação está descrita na Tabela 16.

Figura 35 – Reproduzindo os dados da tabela 16 avaliamos as fermentações mistas utilizando a levedura IQAr/45-2 associada a uma levedura industrial, quanto a variação em biomassa **(A)** etanol **(B)** e ART **(C)** durante uma batelada única à 40°C, utilizando ART de 20% no melaço de alimentação (fluxo de 0,39mL/min. durante 3h), inoculo de 24g.L⁻¹ (9%, v/v) com tempo de fermentação 7 horas.



Podemos observar na Tabela 16 que nas fermentações mistas da levedura IQAr/45-2 associada a mais uma levedura industrial houveram pequenas quedas de viabilidade, com exceção da associação da levedura IQAr/45-2 com a levedura SA-1, que causou uma queda de viabilidade alta (83,5%). Quanto a biomassa (Figura 35 parte A, Tabela 16) pode-se dizer que houve um sinergismo entre a levedura IQAr-2 e as leveduras industriais, pois em todas as combinações houve um acúmulo médio de biomassa da ordem de $4,3 \pm 1,4$ (g.L⁻¹).

Na Figura 35 (parte B) e na Tabela 16, pode-se observar que a produção de etanol durante as fermentações mistas foram equivalentes em relação ao experimento controle (levedura IQAr/45-2 isoladamente), para associação IQAr/45-2 e PE-2, confirmados pelos valores obtidos em relação ao rendimento (85,7%) e produtividade etanólica (12,5 g.L⁻¹.h⁻¹). Já na parte C da Figura 35 observa-se que os teores de açúcares residuais foram menores para associação da levedura IQAr/45-2 e PE-2 (2,6%) e IQAr-2 e SA-1 (3,4%), enquanto que a cultura mista da levedura IQAr/45-2 com a levedura CAT-1 levou um maior residual no meio (4,3%). Levando-se em conta outros parâmetros cinéticos como velocidade de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) produção específica de etano ($Y_{p/s}$) não houve diferenças significativas entre eles, indicando assim, talvez um sinergismo entre as leveduras nestas combinações utilizando a proporção 1:1 de cada linhagem de levedura.

Em relação aos parâmetros fisiológicos descritos na Tabela 16 podemos dizer: i) a proteína total aumentou no final da fermentação para as quatro leveduras; ii) valores de glicerol também apresentaram discretamente elevados no final da fermentação, com

exceção da fermentação mista entre a levedura IQAr/45-2 e a levedura PE-2, que não apresentou variação nenhuma em relação ao início da fermentação; iii) teores de trealose no final da fermentação aumentaram nas quatro leveduras, sendo um indicativo que as células estão sofrendo estresse.

Tabela 16 – Comparação da levedura IQAr/45-2 com as leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) em fermentações mistas (proporção 1:1) quanto aos valores iniciais e finais de viabilidade, biomassa, etanol e açúcar residual em bateladas únicas de fermentação a 40°C, utilizando ART de 20% no melaço (dados da Fig. 35)¹.

Variáveis da Fermentação	Leveduras			
	IQAr/45-2	IQAr/45-2+PE-2	IQAr/45-2+CAT-1	IQAr/45-2+SA-1
Medidas da Fermentação				
Tempo de fermentação (h)	7	7	7	7
Viabilidade				
Inicial (%)	99,4 ± 0,7	99,6 ± 0,6	98,2 ± 2,6	97,8 ± 3,1
Final (%)	92,8 ± 0,5 ^a	90,0 ± 0,7 ^b	90,1 ± 0,7 ^b	83,5 ± 1,3 ^b
p (Teste χ^2)	-	0,684	0,669	0,149
Biomassa				
Inicial (g.L ⁻¹)	23,2 ± 1,2	24,7 ± 0,7	21,1 ± 0,0	22,5 ± 0,5
Final (g.L ⁻¹)	26,8 ± 0,2 ^a	27,7 ± 0,7 ^b	26,9 ± 0,2 ^b	26,7 ± 0,2 ^b
p (Teste t)	-	0,366	0,847	0,620
Acúmulo Final – Inicial (g.L ⁻¹)	3,9 ± 0,8	3,0 ± 0,7	5,2 ± 0,2	4,2 ± 0,5
μ_{Xmax} (g.g.h ⁻¹)	0,81	1,03	1,71	1,4
$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Etanol Final (% v/v)	11,1 ± 1,3 ^a	11,1 ± 0,6 ^b	10,2 ± 0,4 ^b	8,5 ± 0,2 ^b
p (Teste t)	-	0,984	0,517	0,226
μ_{Pmax} (g.g.h ⁻¹)	0,74	0,59	0,43	0,24
$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	0,50 ± 0,01	0,50 ± 0,00	0,51 ± 0,00	0,54 ± 0,00
Produtividade (g.L⁻¹.h⁻¹)	12,5	12,5	11,5	9,6
Rendimento (%)	85,6	85,7	78,7	65,6
ART Final (%)	2,4 ± 0,1 ^a	2,6 ± 0,3 ^b	4,3 ± 0,2 ^c	3,4 ± 0,3 ^b
p (Teste t)	-	0,548	0,006	0,140
Parâmetros fisiológicos				
Proteína Total				
Inicial ($\mu\text{g}_{\text{proteína}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}^{-1}$)	0,30 ± 0,12	0,18 ± 0,01	0,24 ± 0,03	0,21 ± 0,00
Final ($\mu\text{g}_{\text{proteína}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}^{-1}$)	0,47 ± 0,28 ^a	0,24 ± 0,01 ^b	0,31 ± 0,01 ^b	0,24 ± 0,02 ^b
p (Teste t)	-	0,378	0,509	0,363
Glicerol Interno:				
Inicial ($\mu\text{g}_{\text{glicerol}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}^{-1}$)	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,00
Final ($\mu\text{g}_{\text{glicerol}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}^{-1}$)	0,06 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,02 ^b	0,06 ± 0,04 ^b	0,09 ± 0,03 ^b
p (Teste t)	-	0,164	0,568	0,159
Trealose Interna				
Inicial ($\mu\text{g}_{\text{trealose}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}^{-1}$)	34,0 ± 3,4	24,3 ± 0,0	30,7 ± 1,2	40,9 ± 0,0
Final ($\mu\text{g}_{\text{trealose}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}^{-1}$)	71,0 ± 7,4 ^a	65,1 ± 5,2 ^b	61,3 ± 0,2 ^b	75,7 ± 0,6 ^b
p (Teste t)	-	0,457	0,207	0,531

¹ **Condições da fermentação:** Propagação III (baixa agitação à 37°C). Fermentação em melaço suplementado com fluxo de 0,39mL/min. durante 3h, e inóculo de 24g.L⁻¹ (9%, v/v).

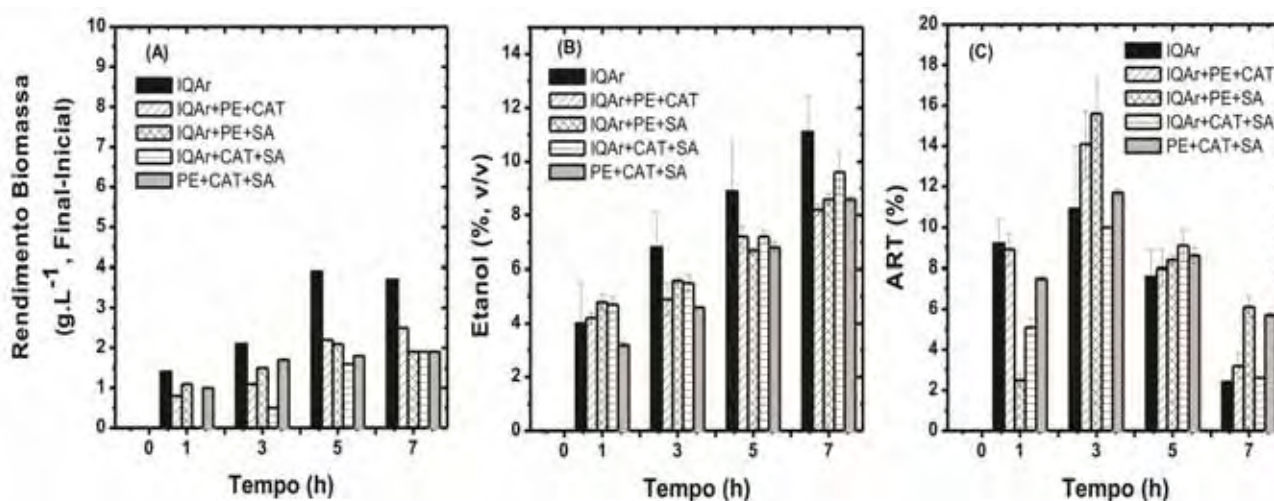
Ensaios realizados com Teste χ^2 ($\alpha = 0,05$) para medidas de viabilidade: “a” médias do experimento controle usado na comparação; “b” a médias estatisticamente equivalentes; “c” médias estatisticamente diferentes.

Ensaios realizados com Teste t ($\alpha = 0,05$): “a” médias do experimento controle usado na comparação; “b” a médias estatisticamente equivalentes; “c” médias estatisticamente diferentes.

4.5.3 Competição entre a levedura IQAr/45-2 associada a duas leveduras industriais (PE-2, CAT-1 E SA-1) em fermentações mistas a 40°C em melaço suplementado com ART inicial de 20%.

A Figura 36 mostra as curvas de rendimento de biomassa, produção de etanol e consumo do açúcar em função do tempo de fermentação da levedura IQAr/45-2 associada a duas leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) a 40°C. Os dados obtidos durante a fermentação estão na Tabela 17.

Figura 36 – Reproduzindo os dados da tabela 17 avaliamos as fermentações mistas utilizando a levedura IQAr/45-2 associada a duas leveduras industriais, quanto a variação em biomassa (A) etanol (B) e ART (C) durante uma batelada única de fermentação à 40°C, utilizando ART de 20% no melaço de alimentação (fluxo de 0,39mL/min. durante 3h), inoculo de 24g.L⁻¹ (9%, v/v) com tempo de fermentação 7 horas.



A Tabela 17 mostra valores obtidos para médias iniciais e finais de viabilidade, biomassa, etanol e açúcar residual em bateladas únicas de fermentação mista da levedura IQAr/45-2 com duas leveduras industriais. As viabilidades apresentaram-se com pequenas quedas durante toda a fermentação em todas as misturas. Quanto as medidas de biomassa (parte A da Figura 36 e Tabela 17) pode-se afirmar que houve pouco sinergismo entre a levedura IQAr/45-2 associadas a duas leveduras industriais, mas mesmo assim, houve um acúmulo médio de biomassa de $2,0 \pm 0,3$ (g.L⁻¹), sendo que a associação entre IQAr/45-2+CAT-1+SA-1 foi a que apresentou menor velocidade de crescimento celular ($\mu_{\text{max}} = 0,91$ g.g.h⁻¹), porém todas as combinações apresentaram um perfil semelhante quanto a velocidade de produção de etanol ($Y_{p/s}$) e de crescimento celular ($Y_{x/s}$).

A parte B da Figura 36 e a Tabela 17 mostram que a levedura IQAr/45-2 quando fermentada individualmente produz maior etanol, e quando associada a mais duas leveduras industriais leva a um menor rendimento de etanol (média de 70,8%) e também produtividade média inferior, da ordem de $10,3 \pm 1,1$ (g.L⁻¹.h⁻¹). Já a parte C da Figura 36 mostra que os teores de açúcares residuais foram mais altos nas fermentações mistas entre 3 leveduras, sendo que a associação da levedura IQAr/45-2 com as leveduras PE-2 e SA-1 deixaram um maior nível de açúcar residual (6,1%).

Em relação aos parâmetros fisiológicos descritos na Tabela 17 pode-se afirmar que: i) houve aumento de proteína total no final da fermentação em todas as combinações; ii) o glicerol interno também se apresentou discretamente elevado no final da fermentação, com exceção da fermentação mista entre as três leveduras comerciais, onde houve uma diminuição do glicerol no final da fermentação; iii) teores de trealose no final da fermentação aumentaram em todas as fermentações mistas.

Tabela 17 – Comparação da levedura IQAr/45-2 com as leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) em fermentações mistas (proporção 1:1:1) quanto aos valores iniciais e finais de viabilidade, biomassa, etanol e açúcar residual em bateladas únicas de fermentação a 40°C, utilizando ART de 20% no melaço.¹

Variáveis da Fermentação	Leveduras				
	IQAr/45-2	IQAr/45-2+ PE-2+CAT-1	IQAr/45-2+ PE-2+SA-1	IQAr/45-2+ CAT-1+SA-1	PE-2+ CAT-1+SA-1
Medidas da Fermentação					
Tempo de fermentação (h)	7	7	7	7	7
Viabilidade					
Inicial (%)	99,4 ± 0,7	98,2 ± 2,6	99,3 ± 0,9	98,2 ± 2,6	97,9 ± 3,0
Final (%)	92,8 ± 0,5 ^a	88,2 ± 1,0 ^b	90,9 ± 0,0 ^b	84,1 ± 0,3 ^b	87,2 ± 0,5 ^b
p (Teste x²)	-	0,473	0,775	0,179	0,402
Biomassa					
Inicial (g.L⁻¹)	23,2 ± 1,2	21,8 ± 0,2	25,6 ± 0,1	25,3 ± 0,1	25,8 ± 0,9
Final (g.L⁻¹)	26,8 ± 0,2 ^a	24,3 ± 0,4 ^c	27,4 ± 0,1 ^b	27,3 ± 0,1 ^b	27,7 ± 1,6 ^b
p (Teste t)	-	0,015	0,181	0,245	0,582
Acúmulo Final – Inicial (g.L⁻¹)	3,9 ± 0,8	3,0 ± 0,3	2,1 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,9 ± 1,5
μ_{Xmax} (g.g⁻¹.h⁻¹)	0,81	0,20	0,31	0,33	0,91
Y_{X/S} (g.g⁻¹)	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,01
Etanol Final (% v/v)	11,1 ± 1,3 ^a	8,2 ± 0,2 ^b	8,6 ± 0,2 ^b	9,6 ± 0,8 ^b	8,6 ± 0,1 ^b
p (Teste t)	-	0,197	0,225	0,200	0,112
μ_{Pmax} (g.g⁻¹.h⁻¹)	0,74	0,24	0,71	0,19	0,24
Y_{P/S} (g.g⁻¹)	0,50 ± 0,01	0,39 ± 0,00	0,49 ± 0,00	0,44 ± 0,00	0,45 ± 0,00
Produtividade (g.L⁻¹.h⁻¹)	12,5	9,2	9,7	10,8	11,6
Rendimento (%)	85,6	63,3	66,4	74,1	79,5
ART Final (%)	2,4 ± 0,1 ^a	3,2 ± 0,6 ^b	6,1 ± 0,5 ^b	2,6 ± 0,0 ^b	5,7 ± 0,1 ^c
p (Teste t)	-	0,317	0,061	0,279	0,001
Parâmetros fisiológicos					
Proteína Total					
Inicial (μg_{proteína}.mg_{célula})	0,30 ± 0,12	0,23 ± 0,00	0,24 ± 0,03	0,21 ± 0,00	0,25 ± 0,00
Final (μg_{proteína}.mg_{célula})	0,47 ± 0,28 ^a	0,32 ± 0,01 ^b	0,31 ± 0,01 ^b	0,24 ± 0,02 ^b	0,26 ± 0,01 ^b
p (Teste t)	-	0,529	0,509	0,363	0,402
Glicerol Interno:					
Inicial (μg_{glicerol}.mg_{célula})	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00
Final (μg_{glicerol}.mg_{célula})	0,06 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,01 ^b	0,06 ± 0,00 ^b	0,06 ± 0,01 ^b	0,04 ± 0,00 ^b
p (Teste t)	-	0,663	0,666	0,921	0,249
Trealose Interna					
Inicial (μg_{trealose}.mg_{célula})	34,0 ± 3,4	31,2 ± 0,0	49,2 ± 0,0	46,9 ± 0,0	64,2 ± 0,0
Final (μg_{trealose}.mg_{célula})	71,0 ± 7,4 ^a	75,2 ± 1,8 ^b	87,5 ± 4,3 ^b	96,7 ± 1,1 ^b	74,8 ± 1,6 ^b
p (Teste t)	-	0,576	0,111	0,129	0,602

¹**Condições da fermentação:** Propagação III (baixa agitação à 37°C). Fermentação em melaço suplementado com fluxo de 0,39mL/min. durante 3h, e inóculo de 24g.L⁻¹ (9%, v/v).

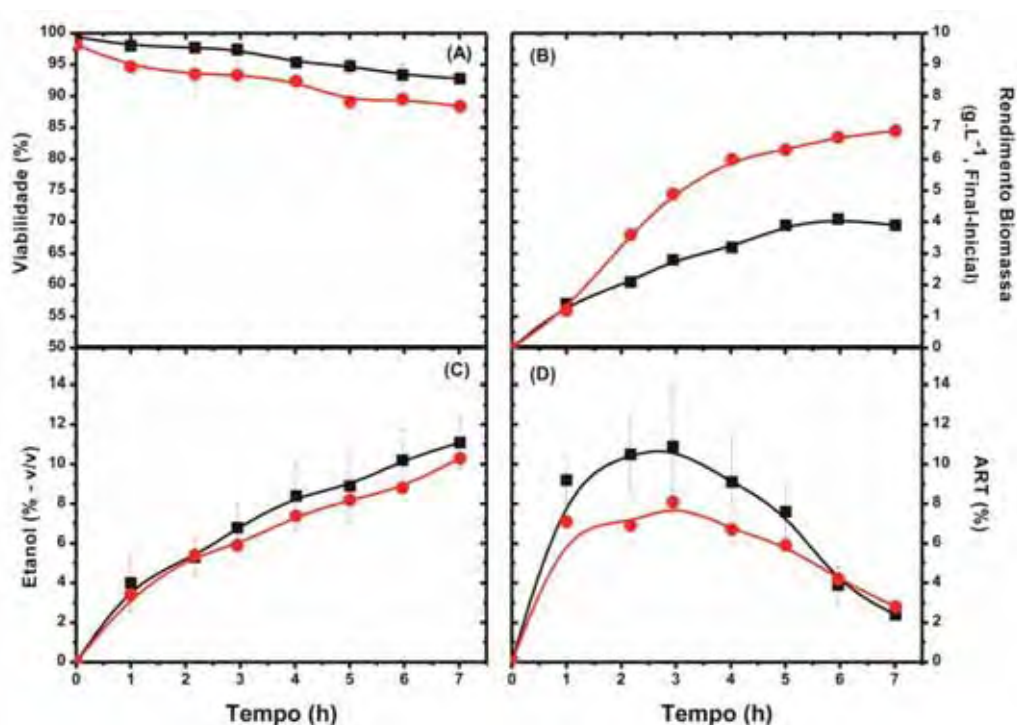
Ensaio realizado com Teste χ^2 ($\alpha = 0,05$) para medidas de viabilidade: “a” médias do experimento controle usado na comparação; “b” a médias estatisticamente equivalentes; “c” médias estatisticamente diferentes.

Ensaio realizado com Teste t ($\alpha = 0,05$): “a” médias do experimento controle usado na comparação; “b” a médias estatisticamente equivalentes; “c” médias estatisticamente diferentes.

4.5.4 Competição entre a levedura IQAr/45-2 associada as leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) em fermentações mistas a 40°C em melaço suplementado com ART inicial de 20%.

A Figura 37 mostra as curvas de viabilidade, rendimento de biomassa, produção de etanol e consumo do açúcar em função do tempo de fermentação da levedura IQAr/45-2 associada a três leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) a 40°C. Os dados obtidos durante a fermentação estão na Tabela 18.

Figura 37 – Reproduzindo os dados da tabela 18 avaliamos as curvas de fermentações mistas utilizando a levedura IQAr/45-2 associada a três leveduras industriais, quanto a variação em viabilidade (A), biomassa (B) etanol (C) e ART (D) durante uma batelada única de fermentação à 40°C, utilizando ART de 20% no melaço suplementado de alimentação (fluxo de 0,39mL/min. durante 3h), inoculo de 24g.L⁻¹ (9%, v/v) com tempo de fermentação 7 horas, sendo valores referente a: levedura IQAr/45-2 (-■-) e fermentação mista entre as leveduras IQAr/45-2+PE-2+CAT-1+SA-1 (-●-).



A parte A da Figura 37 e a Tabela 18, indicam os valores obtidos para fermentação da levedura IQAr/45-2 comparando com a fermentação mista da levedura IQAr/45-2 associada as três leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) para medidas de viabilidade, apresentando pequenas quedas durante toda a batelada. Quanto as medidas de biomassa (Figura 37 parte B, Tabela 18) podemos dizer que houve um acúmulo relativo de biomassa de 6,9 (g.L⁻¹) na fermentação mista. No caso da produção de

etanol, a Figura 37 (parte C) e a Tabela 18 podemos dizer que foram muito próximas, deixando bem evidente o sinergismo positivo da mistura das quatro leveduras. Esta Tabela também mostra os que a levedura IQAr/45-2 apresenta uma velocidade de crescimento ($\mu_{x\max} = 0,81 \text{ g.g.h}^{-1}$) menor que da fermentação mista entre as quatro leveduras ($\mu_{x\max} = 1,50 \text{ g.g.h}^{-1}$), porém com velocidade de formação de etanol ($\mu_{p\max} = 0,74 \text{ g.g.h}^{-1}$) pouco superiores que da mistura. A Figura 37 (parte D) mostra que os teores de açúcares residuais foram baixos.

Em relação aos parâmetros fisiológicos descritos na Tabela 18 podemos dizer: i) a proteína total aumentou no final da fermentação em ambas as condições de fermentação; ii) quanto ao glicerol interno houve uma queda discretamente no final das fermentação mista; iii) teores de trealose no final da fermentação aumentaram para as duas fermentações.

Tabela 18 – Comparação da levedura IQAr/45-2 com a fermentação mista desta levedura associadas as três leveduras industriais (PE-2, CAT-1 e SA-1) quanto aos valores iniciais e finais de viabilidade, biomassa, etanol e açúcar residual em bateladas únicas de fermentação a 40°C, utilizando ART de 20% no melaço.¹

Variáveis da Fermentação	Leveduras	
	IQAr/45-2	IQAr/45-2+PE-2+ CAT-1+SA-1
Medidas da Fermentação		
Tempo de fermentação (h)	7	7
Viabilidade		
Inicial (%)	99,4 ± 0,7	98,2 ± 2,5
Final (%)	92,8 ± 0,5 ^a	88,4 ± 0,6 ^b
p (Teste χ^2)	-	0,505
Biomassa		
Inicial (g.L ⁻¹)	23,2 ± 1,2	25,1 ± 0,1
Final (g.L ⁻¹)	26,8 ± 0,2 ^a	31,9 ± 0,1 ^c
p (Teste t)	-	0,021
Acúmulo Final – Inicial (g.L ⁻¹)	3,9 ± 0,8	6,8 ± 0,1
μ_{Xmax} (g.g.h ⁻¹)	0,81	1,50
$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,00
Etanol Final (% v/v)	11,1 ± 1,3 ^a	10,3 ± 0,1 ^b
p (Teste t)	-	0,566
μ_{Pmax} (g.g.h ⁻¹)	0,74	0,25
$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	0,50 ± 0,01	0,47 ± 0,000
Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	12,5	11,6
Rendimento (%)	85,6	79,5
ART Final (%)	2,4 ± 0,1 ^a	2,8 ± 0,0 ^c
p (Teste t)	-	0,037
Parâmetros fisiológicos		
Proteína Total		
Inicial ($\mu\text{g}_{\text{proteína}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}$)	0,30 ± 0,12	0,20 ± 0,00
Final ($\mu\text{g}_{\text{proteína}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}$)	0,47 ± 0,28 ^a	0,23 ± 0,01 ^b
p (Teste t)	-	0,359
Glicerol Interno:		
Inicial ($\mu\text{g}_{\text{glicerol}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}$)	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,00
Final ($\mu\text{g}_{\text{glicerol}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}$)	0,06 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,00 ^b
p (Teste t)	-	0,064
Trealose Interna		
Inicial ($\mu\text{g}_{\text{trealose}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}$)	34,0 ± 3,4	37,0 ± 0,0
Final ($\mu\text{g}_{\text{trealose}} \cdot \text{mg}_{\text{célula}}$)	71,0 ± 7,4 ^a	57,5 ± 1,9 ^b
p (Teste t)	-	0,242

¹**Condições da fermentação:** Propagação III (baixa agitação à 37°C). Fermentação em melaço suplementado com fluxo de 0,39mL/min. durante 3h, e inóculo de 24g.L⁻¹ (9%, v/v).

Ensaio realizado com Teste χ^2 ($\alpha = 0,05$) para medidas de viabilidade: “a” médias do experimento controle usado na comparação; “b” a médias estatisticamente equivalentes; “c” médias estatisticamente diferentes.

Ensaio realizado com Teste t ($\alpha = 0,05$): “a” médias do experimento controle usado na comparação; “b” a médias estatisticamente equivalentes; “c” médias estatisticamente diferentes.

5 Conclusões

As fermentações industriais são complexas e envolvem interações entre um grande número de leveduras e bactérias. Quase nada se sabe sobre o impacto destas interações em processos com reutilização de células como é o caso da produção de etanol no Brasil. Este trabalho resultou em conclusões interessantes de valor prático em para fermentações industriais devido aos seguintes enfoques:

a) Clarificação do melaço

Com relação ao tratamento do melaço (clarificação) a condição de escolha é adição de H_2SO_4 (pH 4,5) em repouso por 48 horas à 4°C em câmara fria, já que levou a uma redução da absorbância a 600nm. Importante por expressar redução nas quantidades de sólidos totais insolúveis e pigmentos que afetam a avaliação das diversas leituras fotométricas utilizadas neste estudo. Além disto, desejou trabalhar em um sistema livre da material sólido de tal sorte que se pudesse utilizar mediada de biomassa em unidades de massa.

b) Otimização das condições de propagação do inóculo

Estabeleceu-se um meio de propagação para a levedura IQAR-2 durante o qual o rendimento de biomassa aumentou a 30°C sem perda de viabilidade. Com relação a temperatura de propagação, um aumento de 30°C para 37°C possibilitou reduzir o tempo das etapas de propagação sem perda de viabilidade e isto indica adaptação a uma temperatura mais elevada. A melhor condição de propagação estabelecida mostra que a concentração do melaço é crítica para uma boa recuperação da biomassa.

c) Impacto do uso do processo otimizado

Em condições otimizadas a levedura IQAr/45-2 mostrou-se como sendo uma levedura termotolerante, pois produz etanol na ordem de 9,4% (v/v) a altas temperaturas e concentrações de açúcares sem perdas significativas de viabilidade. Esta levedura tolera ciclos de fermentação sucessivos a 37°C, mantendo a quantidade de etanol produzido ao longo dos ciclos.

d) As interações em culturas mistas

A avaliação de culturas constituídas por apenas uma levedura como inóculo, indicam que a levedura PE-2 e SA-1 mostram maior tendência no acúmulo de biomassa, enquanto que as leveduras IQA/45-2 e CAT-1 tendem a produzir mais etanol.

A combinação das leveduras deste trabalho na proporção 1:1 mostrou que, a combinação de IQAr/45-2 e PE-2 apresentam maior rendimento de etanol, enquanto que a mistura IQAr/45-1 e CAT-1 produziram maior biomassa.

A associação entre duas leveduras industriais acrescidas da levedura IQAr/45-2 sugerem uma interação negativa, uma vez que houver diminuição na produção de etanol e acúmulo de biomassa.

A adição da levedura IQAr/45-2 a mistura das três leveduras industriais (PE-2, CAT-1, SA-1) na proporção 1:1:1:1 causou uma recuperação do processo, com aumentos de 1,2 vezes na produção de etanol, 3 vezes em acúmulo de biomassa e 1,6 vezes em relação a trealose interna.

Portanto, a levedura IQAr/45-2 parecer ser capaz de recuperar fermentações industriais lentas ou interrompidas, onde os efeitos das interações entre leveduras são maiores, mais complexos e diversificados.

Referências

Referências

- ALBERS, E.; LARSSON, C.; LIDÉN, G.; NIKLASSON, C.; GUSTAFSSON, L. Influences of the nitrogen sources on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3181-3195, 1996.
- ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 20-27, 1998.
- AMORIN, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. C.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1267-1275, 2011.
- AMORIN, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; ZAGO, E. A.; BASSO, L. C.; GALLO, C. R. **Processo de fermentação alcoólica, seu controle e monitoramento**. Piracicaba: FERMENTEC, 1989. p. 145.
- ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. **MultiCiência**, n. 7, out. 2006. Disponível em: < http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_02_7.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2007.
- BANAT, I. M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R.; McHALE, A. P. Review: ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: part I - yeasts in general. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.14, p. 809-821, 1998.
- BARRAJÓN, N.; AVÉRALO-VILLENA, M.; ÚBEDA, J.; BRIONES, A. Enological properties in wild and commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts: relationship with competition during alcoholic fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 27, p. 2703-2710, 2011.
- BASSETTO, N. Z. **SEPPA**: sistema especialista para planta de produção de álcool. 2006. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed). **Biofuel production-recent developments and prospects**. Rijeka: InTech, 2011. Cap. 5, p. 85-100.
- BASSO, L. C.; AMORIN, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1155-1163, 2008.
- BIOLOGIA. **Embriologia**: reprodução e ciclos de vida. 2011. Disponível em: <<http://biologiaassuntos.blogspot.com.br/2011/10/embriologia.html>>. Acesso em: 25 nov. 2012.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Álcool combustível**. Disponível em:
<<http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/interna/interna.php?area=2&menu=999>>.
Acesso em: 20 dez. 2011.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Etanol. **Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis**, n. 57, out. 2012. Disponível em:
<http://www.mme.gov.br/spg/galerias/arquivos/publicacoes/boletim_mensal_combustiveis_renovaveis/Boletim_DCR_nx_057_-_outubro_de_2012.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2012.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística**. São Paulo: Artmed, 2003.

CEBALLOS-SCHIAVONE, C. H. M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos – *Lactobacillus* – na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol**. 2009. 178 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

CECCATO ANTONINI, S. R. Biotechnological implications of filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 7, p. 1151-1161. 2008.

CORADELLO, L. F. C. **Condições de propagação e revitalização para a produção de etanol pela linhagem IQAr/45-2 da leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em fermentações sucessivas**. 2012. 122 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

CORDONA, C. A.; SANCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2415–2457, 2007.

DARAMOLA, M. O.; ZAMPRAKA, L. Experimental study of the production of biomass by *Saccharomyces cerevisiae* in a fed batch fermentor. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 8, p. 1107-1114, 2008.

DORTA, C.; OLIVA NETO, P.; ABREU NETO, M. S.; NICOLAU JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A. I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 177–182, 2006.

FARREL, A. E.; PLEVIN, R. J.; JONES, A. D.; O'HARE, M.; KAMMEN, D. M. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. **Science**, v. 311, p. 506-508, 2006.

FERREIRA, A. V. B. Fungos: os primórdios do sexo. **Ciência Hoje**, v. 37, n. 218, p. 34-41, 2005. Disponível em:
<www.icb.ufmg.br/big/big623/artigo-%20sexo%20dos%20fungos.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2008.

FLEET, G. H. Wine yeasts for the future. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 979-995, 2008.

FLEET, G. H.; HEARD, G. Yeasts-growth during fermentation. In: FLEET, G. H. **Wine microbiology and biotechnology**. London: Harwood Academic Publishers, 1993. v. 2, p. 27-54.

FOLCH-MALLOL, J. L.; GARAY-ARROYO, A.; LLEDIAS, F. La respuesta a estrés en la levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 46, n. 1/2, p. 24-46, 2004.

GUEIROS, R. S. **Otimização das técnicas de manipulação genética de leveduras industriais para aplicação na produção de álcool combustível**. 2006. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

HERRERA, S. Bonkers about biofuels. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 756-759, 2006.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2, cap.6, p. 93-122.

IVORRA, C.; PÉREZ-ORTIN, J. E.; OLMO, M. An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, p. 698-708, 1999.

LALUCE, C. Current aspects of fuel ethanol-production in Brazil. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 149-161, 1991.

LALUCE, C.; TOGNOLI, J. O.; OLIVEIRA, K. F.; SOUZA, C. S.; MORAIS, M. R. Optimization of temperature, sugar concentration and inoculums size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, p. 627-637, 2009.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid-determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 11, n. 3, p. 641-649, 1981.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIN, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 1-43. (Biotecnologia Industrial, 3).

LLOYD, D.; MORELL, S.; CARLSEN, H. N.; DEGN, H.; JAMES, P. E.; TOWLANDS, C. C. Effects of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 9, n. 8, p. 825-833, 1993.

LYND, L. R.; AHN, H. J.; ANDERSON, G.; HILL, P.; KERSEY, D. S.; KLAPATCH, T. Thermophilic ethanol production - investigation of ethanol yield and tolerance in continuous culture. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28/29, p. 549-569, 1991.

MADRID, A.; CENZANO, E.; VICENT, J. M. **Manual de indústrias de alimentos**. São Paulo: Varela, 1995. p. 599.

MAHMUD, S. A.; NAGAHISA, K.; HIRASAWA, T.; YOSHIKAWA, K.; ASHITANI, K. Effect of trehalose accumulation on response to saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 26, p. 17-30, 2009.

MENEGHIN, S. P.; REIS, F. C.; ALMEIDA, P. G. de; CECCATO-ANTONINI, S. R. Chlorine dioxide against bacteria and yeast from the alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 337-343, 2008.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

NAGAI, S. Diagnostic color differentiation plates for hereditary respiration deficiency in yeast. **Journal of Bacteriology**, v. 86, p. 299-302, 1963.

NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. G. **Aguardente de cana**. Botucatu: FCA/ UNESP, 2005.

OLIVEIRA, M. C. F. L.; PAGNOCCA, F. C. Aplicabilidade de meios seletivos empregados na indústria cervejeira para detecção de leveduras selvagens em unidades sucro-alcoleiras. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 8., 1988, São Lourenço. **Anais...**: São Paulo: SBM, 1988. p. 78-81.

PELCZAR JUNIOR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1997. p. 524.

PRETORIUS, I. A. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking review. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

QUEROL, A.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.; DEL OLMO, M.; BARRIO, E. Adaptive evolution of wine yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 1-2, p. 3-10, 2003.

RIVERA, C. R.; COSTA, A. C.; ATALA, D. I. P.; MAUGERI, F.; MACIEL, M. R. W.; MACIEL FILHO, R. Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: application to ethanol fermentation considering the effect of temperature. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1682–1687, 2006.

ROBYT, J. F.; WHITE, B. J. Qualitative and quantitative methods for determining biological molecules. In: ROBYT, J. F.; WHITE, B. J. **Biochemical techniques**: theory and practice. Illinois: Waveland Press, 1990. Cap. 7, p. 235.

ROTH, R. Carbohydrate accumulation during the sporulation of yeast. **Journal of Bacteriology**, v. 101, n. 1, p. 53-57, 1970.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. 5. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2.

SHERMAN, F.; HICKS, J. Micromanipulation and dissection of asci. In: GUTHRIE, C.; FINK, G. R. (Ed.). **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1991. v. 194, p. 21-37.

SQUAREZI, C.; LONGO, C.; CENI, G.; BONI, G.; SILVA, M. F.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. TREICHEL, H. Inulase production by agro-industrial residues: optimization of pretreatment of substrates and production medium. **Food and Bioprocess Technology**, n. 2, p. 409-414, 2009.

SILVA, L. A. F. **Exigências nutricionais e operacionais para a produção de etanol pela levedura IQA/45-1 a partir do melaço em batelada alimentada**. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

SOUZA, C. C.; THOMAZ, D.; CIDES, E. R.; OLIVEIRA, K. F.; TOGNOLLI, J.; LALUCE, C. Genetic and physiological alterations occurring in a yeast population continuously propagated at increasing temperatures with cell recycling. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1667-1677, 2007.

THEVELEIN, J. M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. **Microbiological Reviews**, v. 48, n. 1, p. 42-59, 1984.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Moagem de cana atinge 488,46 milhões de toneladas no centro-sul do país**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/releases/show.asp?rlsCode={AC0551DF-D28F-4C90-9F12-415A89416327}>> Acesso em: 20 dez. 2011.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Álcool combustível: características**. Disponível em: <http://www.portalunica.com.br/portalunica/index.php?Secao=UNICA%20em%20ação&SubSecao=álcool%20combustível&SubSubSecao=características&id=%20and%20id=1>>. Acesso em: 10 dez. 2007.

WALKER, M. W. **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: John Wiley & Sons, 1998.

WIKILIVROS. **Engenharia genética: *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico em engenharia genética**. Disponível em: <http://pt.wikibooks.org/wiki/Engenharia_gen%C3%A9tica/Saccharomyces_cerevisiae_como_modelo_biol%C3%B3gico_em_engenharia_gen%C3%A9tica> . Acesso: 25 nov. 2012.

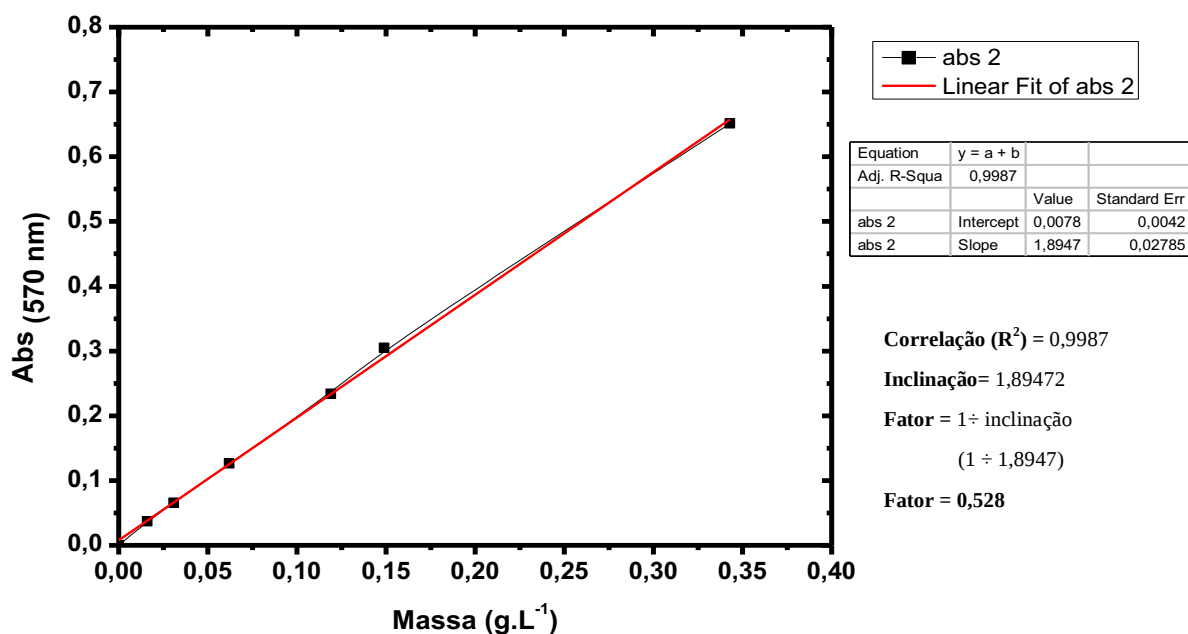
YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, n. 3, p. 508-514, 1954.

ZARPELON, F.; ANDRIETTA, S. R. **Fermentação contínua para produção de álcool: STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**. Piracicaba: STAB, 1992. p. 23-28.

ZHAO, X. Q.; XUE, C.; GE, X. M.; YUAN, W. J.; WANG, J. Y.; BAI, F. W. Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield of self-flocculating yeast in continuous ethanol fermentation. **Journal of Biotechnology**, v. 139, p. 55-60, 2009.

APÊNDICE A - Curva padrão de biomassa da levedura IQAr/45-2

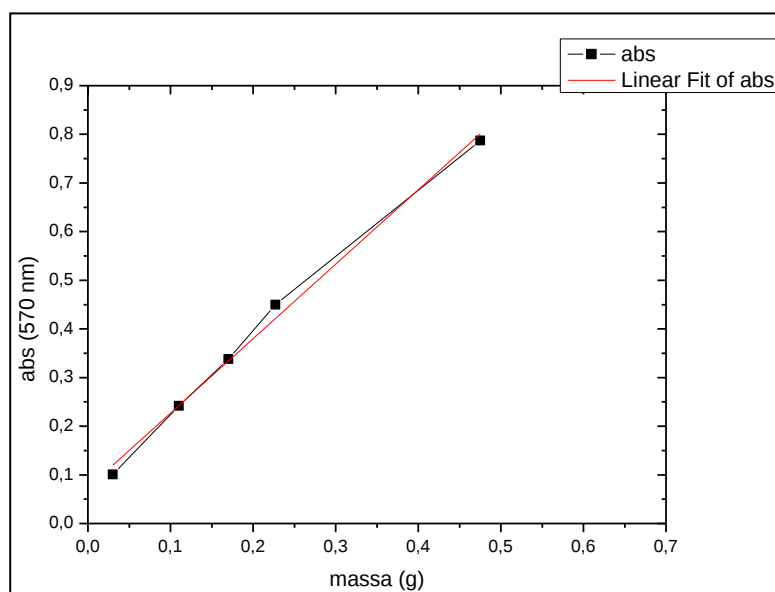
Figura 10 - Curva-padrão para a relação de biomassa seca da levedura IQAr/45-2 com valores de absorbância. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $a=1,8947$, coeficiente linear $b=0,0078$, fator de correlação ($R^2 = 0,9987$), assim obtendo o fator de correlação absorbância em biomassa seca (F) foi de 0,528 ($1/b$) para o espectrofotômetro BIOESPECTRO modelo SP-22.



Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE B - Curva padrão de biomassa da levedura PE-2

Figura 11 - Curva-padrão para a relação de biomassa seca da levedura PE-2 com valores de absorbância. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $a=1,531$, coeficiente linear $b=0,0073$, fator de correlação ($R^2 = 0,9931$), assim obtendo o fator de correlação absorbância em biomassa seca (F) foi de $0,653$ ($1/b$) para o espectrofotômetro BIOESPECTRO modelo SP-22.



Equation	y = a + b*x		
Adj. R-Square	0,99314		
		Value	Standard Error
abs	Intercept	0,07372	0,01606
abs	Slope	1,53103	0,06356

Correlação (R^2) = 0,99314

Inclinação = 1,53103

Fator = $1 \div \text{inclinação}$
 $(1 \div 1,53103)$

Fator = 0,653

ou Fórmula:

$$y = a + bx$$

PE-2

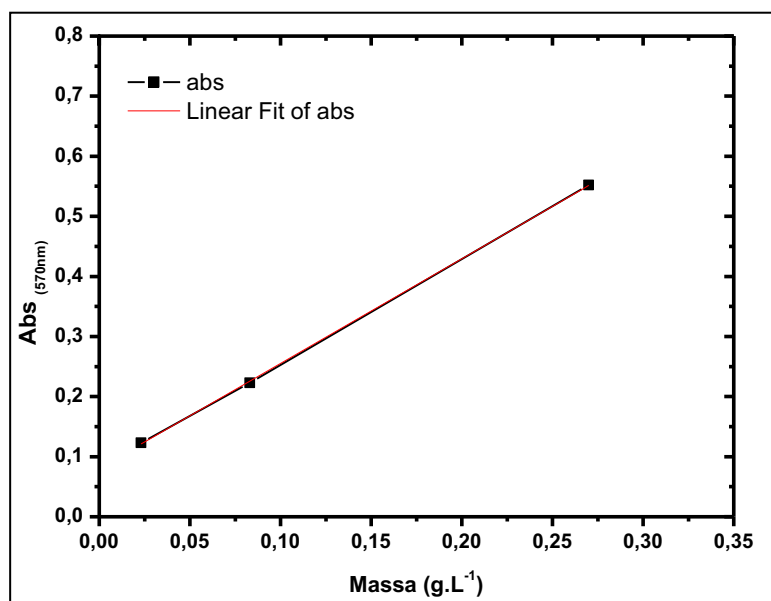
$$\text{abs} = 0,07372 + 1,53103 (\text{massa})$$

$$\text{massa} = \frac{\text{abs} - 0,07372}{1,53103}$$

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE C - Curva padrão de biomassa da levedura CAT-1

Figura 12 - Curva-padrão para a relação de biomassa seca da levedura CAT-1 com valores de absorbância. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $a=1,742$, coeficiente linear $b=0,0809$, fator de correlação ($R^2 = 0,99978$), assim obtendo o fator de correlação absorbância em biomassa seca (F) foi de 0,574 ($1/b$) para o espectrofotômetro BIOESPECTRO modelo SP-22.



Equation	y = a + b*x		
Adj. R-Square	0,99978		
		Value	Standard Error
abs	Intercept	0,08098	0,00296
abs	Slope	1,74221	0,01809

Correlação (R^2) = 0,99978

Inclinação = 1,74221

Fator = $1 \div \text{inclinação}$
($1 \div 1,74221$)

Fator = 0,574

ou Fórmula:

$$y = a + bx$$

CAT-1

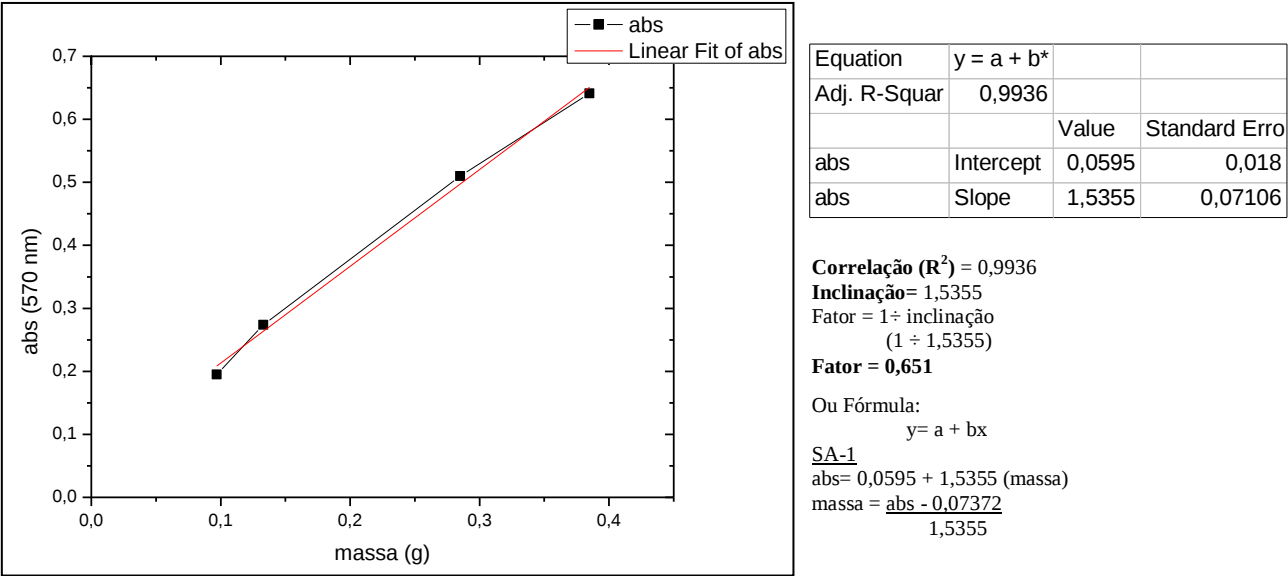
$$\text{abs} = 0,08098 + 1,74221 (\text{massa})$$

$$\text{massa} = \frac{\text{abs} - 0,08098}{1,74221}$$

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE D - Curva padrão de biomassa da levedura SA-1

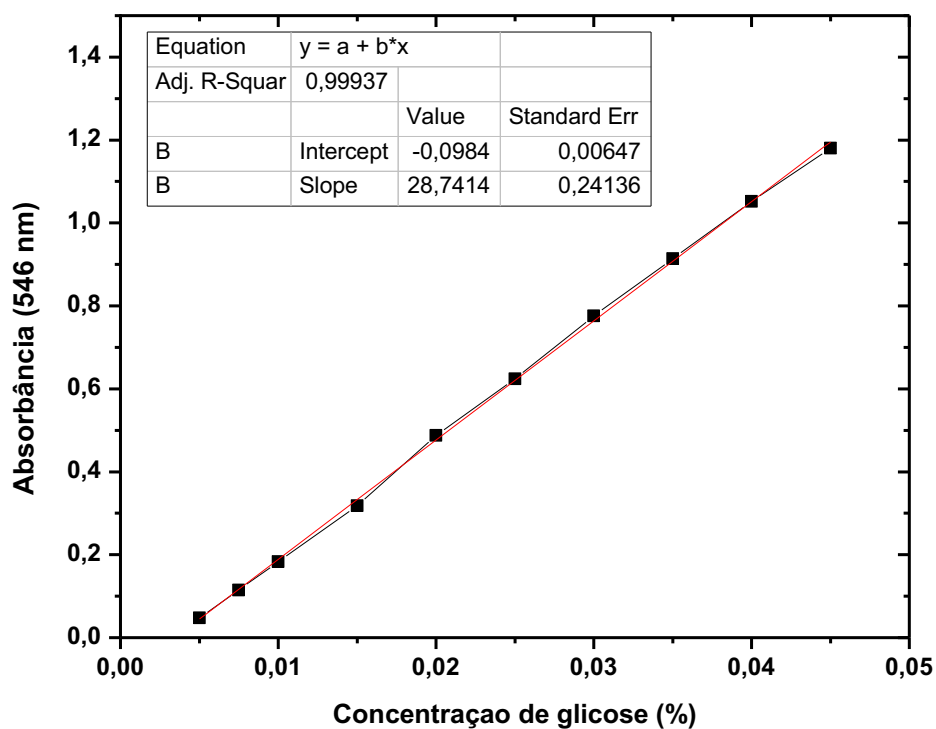
Figura 13 - Curva-padrão para a relação de biomassa seca da levedura SA-1 com valores de absorvância. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular a=1,535, coeficiente linear b=0,0595, fator de correlação ($R^2 = 0,9936$), assim obtendo o fator de correlação absorvância em biomassa seca (F) foi de 0,651 (1/b) para o espectrofotômetro BIOESPECTRO modelo SP-22.



Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE E - Curva Padrão de Glicose 0,2%

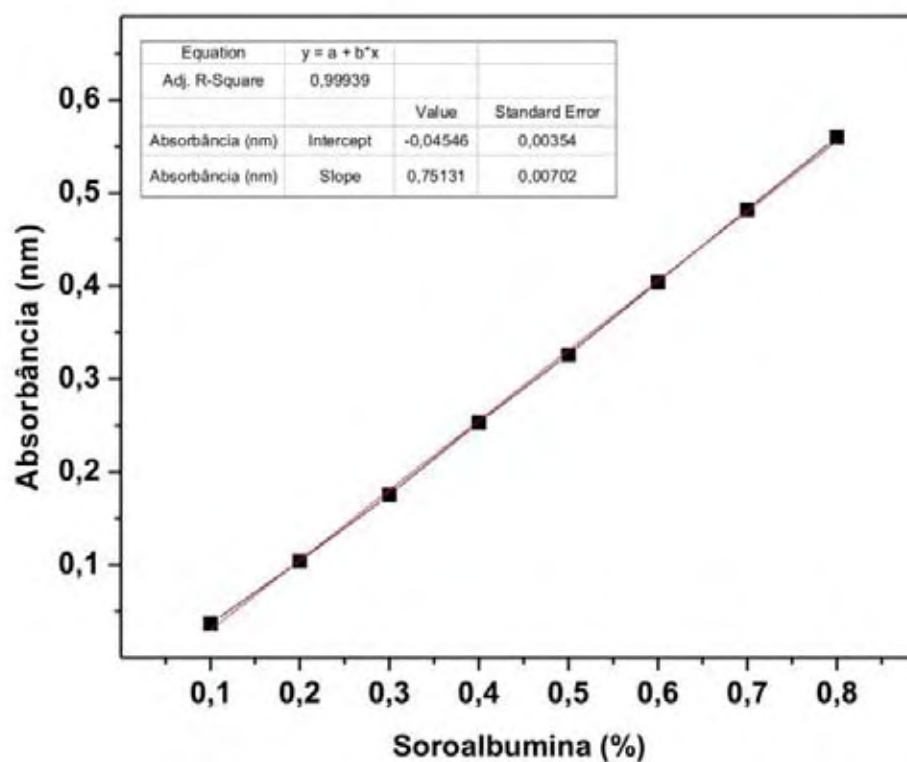
Figura 15 - Curva de solução de glicose 0,2% (% m/v) para a dosagem do açúcar residual total pelo método de 3,5 DNS (MILLER, 1959). A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=28,74$, intercepto da reta $a=-0,098$ e fator de correlação ($R^2 = 0,999$) para o espectrofotômetro BIOESPECTRO (SP-22).



Fonte: elaborada pela autora.

ANEXO A - Curva Padrão de Soroalbumina 0,1%

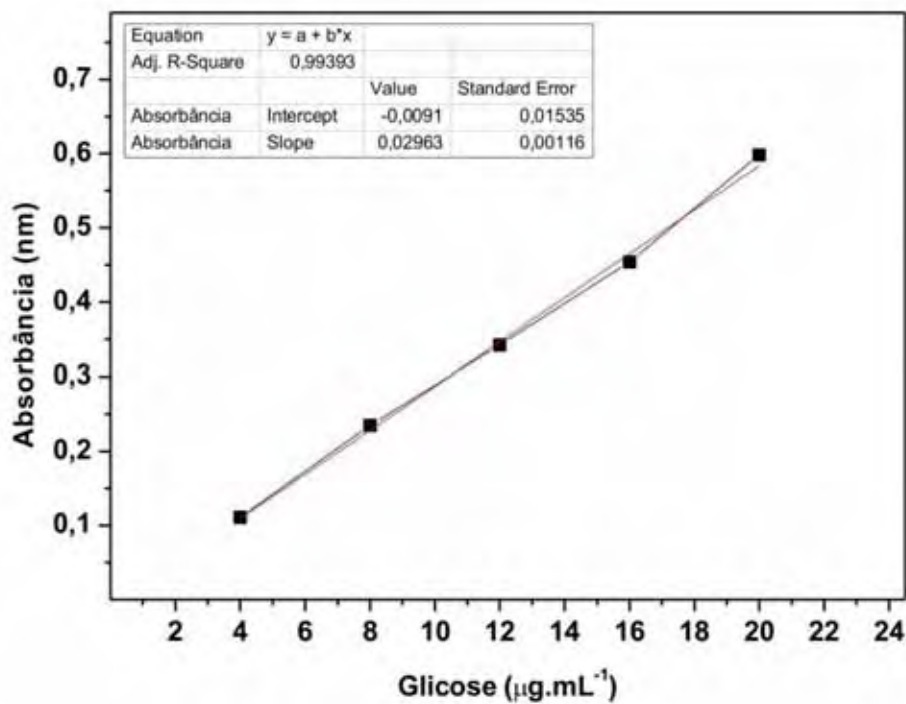
Figura 16 - Curva padrão de calibração de soroalbumina 1% (m/v) para a dosagem de proteína total pelo feitas pelo método do reagente de Biureto. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=0,751$, intercepto da reta $a=-0,045$ e fator de correlação ($R^2=0,999$) para o espectrofotômetro BIOESPECTRO (SP-22).



Fonte: Coradello (2012).

ANEXO B - Curva Padrão de Glicose 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

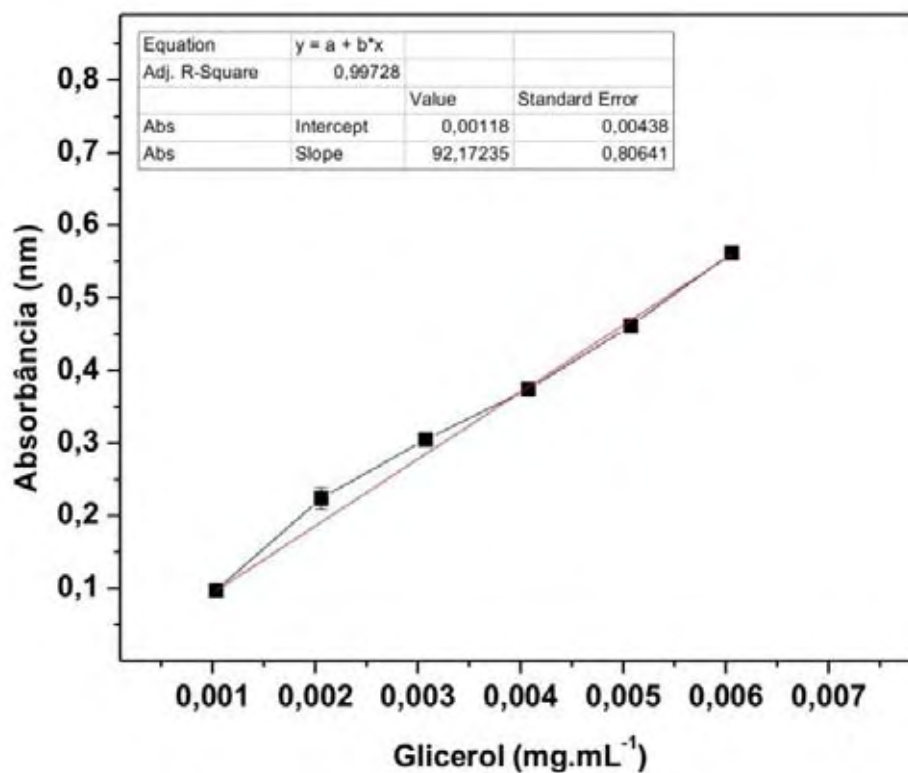
Figura 17 - Curva padrão de calibração de glicose 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para dosagens de trealose pelo método da Antrona. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=0,030$, intercepto da reta $a=-0,009$ e fator de correlação ($R^2=0,994$) para o espectrofotômetro BIOESPECTRO (SP-22).



Fonte: Coradello (2012).

ANEXO D - Curva Padrão de Glicerol 0,208 mg.mL⁻¹

Figura 18 - Curva padrão de calibração de glicerol 0,208 mg.mL⁻¹ para dosagens de glicerol através de kit enzimático. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular b=92,17, intercepto da reta a=-0,001 e fator de correlação (R²=0,997) para o espectrofotômetro BIOESPECTRO (SP-22).



Fonte: Coradello (2012).